

血管内皮細胞間接着の制御機構

著者	安藤 康史
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15781号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58783

博士論文

血管内皮細胞間接着の制御機構

東北大学大学院薬学研究科

生命薬学専攻

細胞情報薬学分野

B1YD1027 安藤 康史

目次

第一章	序論	1
第二章	実験方法	6
第三章	実験結果	13
第四章	考察	34
第五章	謝辞	38
第六章	参考文献	39

略語表

本文中の略語は以下に示す一覧表に従って用いた。

ATP	adenosine 5'-triphosphate
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic AMP
CAB	circumferential actin bundles
CFP	cyan fluorescent protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EC	endothelial cell
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
FBS	fetal bovine serum
FGD5	facio-genital dysplasia-5
FSK	forskolin
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GFP	green fluorescent protein
GST	glutathione S-transferase
GTP	guanosine 5'-triphosphate
HAEC	human aortic endothelial cell
HMVEC	human lung microvascular endothelial cell
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G

IRES	internal ribosomal entry site
MRCK	myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase ; official gene name CDC42 binding protein kinase
NLS	nuclear localization signal
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PH	pleckstrin homology
Raichu	Ras and interacting protein chimeric unit
RLC	regulatory light chain
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
TCL	total cellular lysate
VE	vascular endothelial
VEGF	vascular endothelial growth factor
YFP	yellow fluorescent protein

第一章 序論

全身に張り巡らされた血管は、諸臓器や組織に酸素や栄養を供給し、かつ組織からの老廃物や不要分子を回収する重要な役割を担っている。また分子の運搬だけでなく、感染、炎症、癌などの病態時に免疫担当細胞を到達させる器官としても機能している。

血管の内腔面には内皮細胞間接着によって構築される内皮細胞シートが存在し、内皮細胞シートの外側を細胞外基質と血管平滑筋細胞またはペリサイトといった壁細胞が覆う。内皮細胞間接着によって構築される内皮細胞シートは、血液成分が血管外の組織へ漏れ出さないようなバリアとして機能する。通常、血管透過性はこのバリアによって非常に低い状態に保たれている。しかし、炎症の際に炎症細胞が血管外へ遊出するときや、血管新生が誘導されるときなどには、この内皮細胞間接着は弱まり、血管透過性が亢進する(1)。このように内皮細胞間接着に起因するバリア機能は、非常にダイナミックに、しかし厳密に制御されている。この制御機構の破綻は、肺水腫、ネフローゼ、敗血症、蕁麻疹、癌、アレルギー性疾患(アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎など)など様々な疾患および随伴症状の発症と密接に関連している(1)。従って、内皮細胞間接着の制御機構の解明は疾患の原因解明や治療薬の開発に貢献すると期待される。加えて、末梢動脈閉塞性疾患や虚血性心疾患に対し細胞移植や薬剤などによる血管再生療法が試みられており、内皮細胞間接着の制御機構の理解は機能的血管再生にも大きく貢献すると期待される。

内皮細胞間接着は、*adherence junction* と *tight junction* という 2 つのタイプの結合装置により構成されている(Fig. 1 A)(2, 3)。*Adherence junction* は内皮細胞間接着の初期形成、成熟および維持に関与する。*Tight junction* は *adherence junction* が形成された後に発達するとされ、血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞に代表されるように、より強固な細胞間接着の形成に貢献し、細胞間隙を介した物質の透過を厳しく制限する(1)。*Tight junction* を構成する接着分子であり、内皮細胞特異的に発現する *claudin-5* のノックアウトマウスでは血液脳関門の透過性に異常が生じるが、それ以外の血管では異常が見られない(1)。一方、*adherence junction* を構成する接着分子である *vascular endothelial(VE)-cadherin* に対する中和抗体を投与すると血管透過性が著しく上昇するこ

とから(4)、血液脳関門を形成する血管を別にして、血管透過性は adherence junction により主に制御されていると考えられている。接着分子 VE-cadherin は内皮細胞特異的に発現し、カルシウム存在下でシスのホモフィリック二量体を形成し、さらに隣り合う細胞のシス二量体がトランス結合することで、細胞間接着の形成に貢献する(Fig. 1 B)。さらに VE-cadherin は細胞内領域において α/β -catenin を介してアクチン繊維と結合することから、VE-cadherin 接着の制御にアクチン繊維が大きく関与する(Fig. 1 B)(2)。

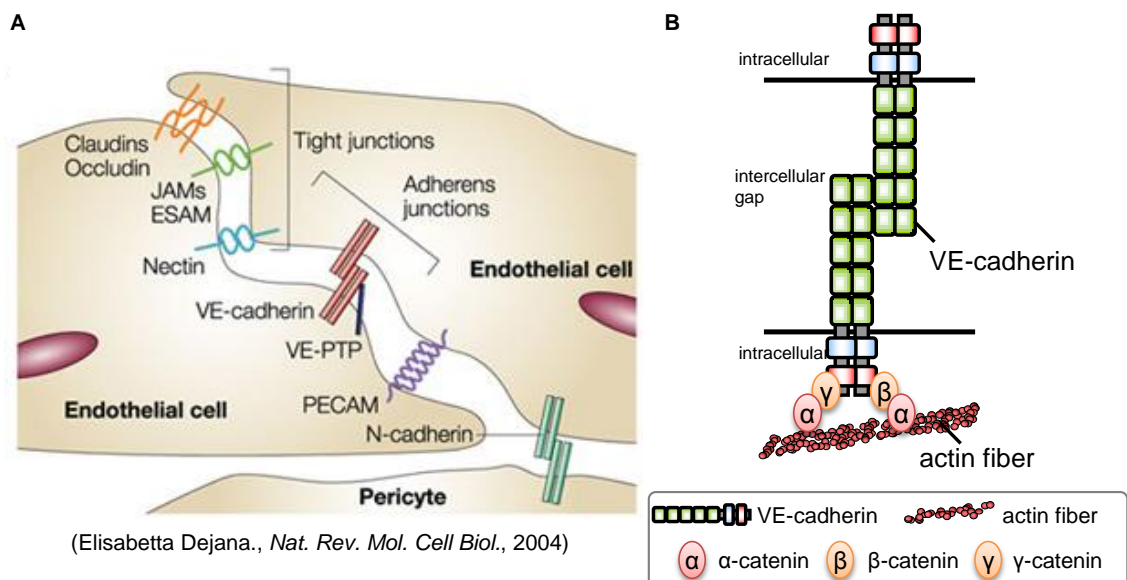


Figure 1. (A) Endothelial cells have two specialized junctional domains, tight junctions and adherens junctions, involved in cell-cell adhesion. Adhesion molecules in tight junctions and adherens junctions are shown. See details in (3). (B) Structure of VE-cadherin. VE-cadherin is connected to actin fibers through catenins.

VE-cadherin 接着は、様々なシグナルによって正・負の調節を受け、それにより内皮細胞間接着および血管のバリア機能がダイナミックに制御される(Fig. 2)(2)。例えば thrombin や histamine などの炎症性メディエーターが負の制御因子として働き、細胞内を横断するアクチン繊維(stress fiber)の形成を介して内皮細胞の収縮を惹起することで VE-cadherin 接着を破壊し、血管透過性を上昇させる(5, 6)。また vascular endothelial growth factor(VEGF)も細胞間接着の減弱を引き起こし、この細胞間接着の減弱が血管新生の引き金として重要であると考えられている(1, 7-9)。一方、代表

的な正の制御因子として細胞内セカンドメッセンジャーである cyclic AMP(cAMP)が知られている(10)。Adrenomedullin、prostaglandin E₂、prostacyclin、 β 受容体刺激薬など、細胞内 cAMP 濃度の上昇を引き起こす G タンパク質共役型受容体刺激薬は、炎症性刺激による血管透過性の亢進を抑制する(Fig. 2)(11-13)。逆に lipopolysaccharide や tumor necrosis factor- α は phosphodiesterase の活性化を介して細胞内 cAMP 濃度を低下させることにより、血管透過性を亢進させることが報告されている(14)。また、adrenomedullin 欠損マウスは、内皮細胞間接着および内皮細胞の細胞間マトリックスへの接着異常により胎生致死となることから、cAMP が内皮細胞間接着の維持に重要な役割を担っていることが示唆される(15)。

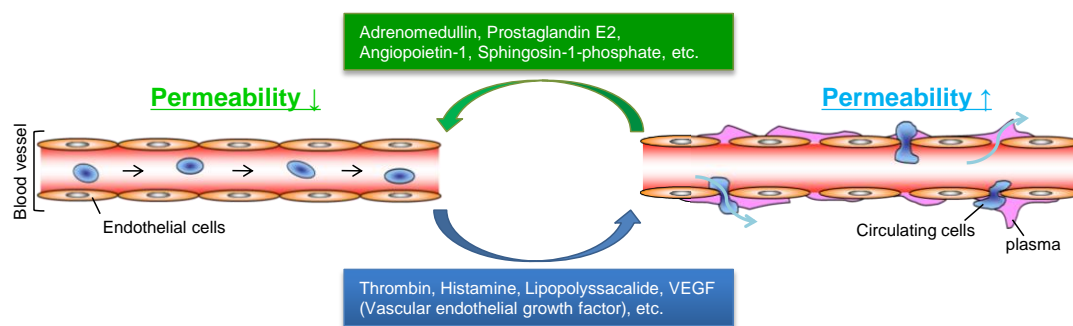


Figure 2. Regulation of vascular permeability by the factors that enhance or decrease endothelial barrier function.

cAMP はそのエフェクター分子である exchange protein directly activated by cAMP(Epac)を介して Ras スーパーファミリーに属す低分子量 G タンパク質 Rap1 を活性化することで、VE-cadherin による内皮細胞間接着の亢進とそれに引き続く血管透過性の抑制をもたらす(10, 16)。Rap1 には 95%の相同性をもつアイソフォーム Rap1A および Rap1B が存在し、ユビキタスな発現が認められるが血小板や内皮細胞では Rap1B の発現がより優位に認められる(17-19)。Rap1A、Rap1B ともに細胞-細胞間接着の制御に加え、integrin を介した細胞-基質間接着や細胞極性、細胞移動、細胞増殖など多様な細胞機能の制御に関与している。内皮細胞バリアに対しては、Rap1A 欠損マウスでは出血を示さない一方、Rap1B 欠損マウス(18)やゼブラフィッシュを用いた解析(19)から、特に Rap1B が血管のバリア機能の維持に重要な役割を持つことが示唆される。また、我々はこれまでに

Epac の特異的活性化剤である 007 をマウスの静脈内に投与することによって Rap1 を活性化させると、基底状態における血管透過性を抑制するとともに VEGF による血管透過性亢進もほぼ完全に抑制することを見出した。このように Rap1 は内皮細胞バリアの維持・増強に重要であり、cAMP-Epac-Rap1 シグナルによる内皮細胞間接着の維持・増強機構を明らかにすることは、血管透過性の亢進に起因した疾患の治療や機能的血管再生に貢献するものと期待される。

これまでの解析から、Rap1 は細胞間接着部位に並走するアクチン繊維の束(circumferential actin bundles:CAB)を形成することにより、細胞間接着部位における VE-cadherin 接着の安定性を向上させ内皮細胞間接着を亢進させることが分かってきた(20)。VE-cadherin は α/β -catenin を介して細胞間接着部位に並走するアクチン繊維(CAB)に結合し、このアクチン繊維(CAB)を足場とすることで、安定したトランス結合が可能になると考えられている。しかし、Rap1 がアクチン細胞骨格系を制御するメカニズムは長い間不明であった。そこで、より深い内皮細胞間接着の制御機構の理解を得るために、本研究では不明であった Rap1 によるアクチン細胞骨格系の制御機構の解明を目指し、アクチン繊維とともに収縮性繊維束を構成する myosin に着目し解析を行った。

Myosin は ATP を加水分解することによってエネルギーを得て、アクチン繊維上を動くモータータンパク質である。Non-muscle myosin II(以下、単に myosin II と呼ぶ)は、筋細胞を含めたすべての細胞に存在し、細胞-基質間接着、細胞移動、細胞の形態変化などさまざまな細胞機能において重要な役割を担っている(20)。Myosin II は 2 本ずつの重鎖、必須軽鎖、調節軽鎖の 6 サブユニットから構成され、調節軽鎖(regulatory light chain; RLC)の Ser19 もしくは Thr18/Ser19 がリン酸化を受けると(アクチン存在下で) Mg^{2+} -ATP アーゼ活性が上昇するとともに、双極性の myosin II フィラメントが形成されアクチン繊維に張力が生じる(21)。脊椎動物には 3 種類の myosin II 重鎖アイソフォーム(MHC-IIA、IIB、IIC)が存在し、それぞれがホモダイマーを形成して myosin IIA、IIB、IIC となる(22, 23)。Myosin IIA、IIB はそれぞれの重鎖のノックアウトマウスが胎生致死となることから、生体内ではそれぞれ補完できない重要な機能を持つことが示唆されている(24-26)。注目すべき点として、myosin IIA のノックアウトマウスは細胞間接着が損なわれ、組織形成が正常に行われず胎生初期に致死となる(24)。In vitro の実験でも、myosin IIA が上皮細胞における E-cadherin を介した細胞間

細胞間接着の安定化に関与することが示された(27)。一方、myosin IIB のノックアウトマウスは心臓または脳の形成異常が致死の原因だと考えられている(25, 26)。興味深いことに、最近 Smutny らによって Rap1 が上皮細胞において myosin IIB の細胞間接着部位への局在化を制御し、その myosin IIB が上皮細胞の細胞間接着部位におけるアクチン繊維の形成を制御することで、E-cadherin を介した細胞-細胞間接着の安定化に関与することが示された(27)。また、Abraham らによって内皮細胞でも myosin II が VE-cadherin を介した細胞間接着の安定化に関与することが示された(28)。これらの知見から myosin II を足掛かりとすることにより、Rap1 によるアクチン細胞骨格系の制御機構の解明に繋がると予想した。

cAMP-Epac-Rap1 によるアクチン細胞骨格系の制御は、内皮細胞間接着の調節に重要な役割を担っており、そのメカニズムの解明は健常血管の維持・再生を目指した治療薬の開発に貢献すると期待された。そこで本研究では、新規治療薬の開発へと展開していく研究基盤を形成するべく、myosin II に焦点を当て、cAMP-Epac-Rap1 による細胞間接着部位におけるアクチン繊維の形成メカニズムの解析を行った。

第二章 実験方法

2-1. 試薬・抗体

用いた試薬および購入先は以下のとおりである。Forskolin および latrunculin A は Calbiochem から、8-pCPT-2'-O-methyl-cAMP (以下 007 と呼ぶ)は Tocris Bioscience から、*N*⁶-benzoyl-cAMP (6-Bnz)は Biolog Life Science Institute から、(R)-(+)-trans-N-(4-pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamide・2HCl・H₂O(Y27632)は和光純薬工業から、(-)-blebbistatin は Sigma-Aldrich から、細胞外毒素 C3トランスフェラーゼ(C3 toxin)は Cytoskeleton から、Cellmatrix type IC は新田ゼラチンから購入した。用いた抗体および購入先は以下のとおりである。マウス抗 cadherin-5(VE-cadherin)抗体および抗 Cdc42 抗体は BD Biosciences から、抗 Rap1 抗体は Santa Cruz Biotechnology から、抗 FGD5 抗体(免疫染色用。#HPA019191)、抗β-アクチン抗体および抗 FLAG(M2)抗体は Sigma-Aldrich から、ウサギ抗 VE-cadherin 抗体、抗 myosin II 重鎖 A(MHC-IIA)抗体、抗 myosin II 重鎖 B(MHC-IIB)抗体、抗リン酸化 myosin 軽鎖(Ser19)(pRLC)抗体および抗リン酸化 myosin 軽鎖(Thr18/Ser19)(ppRLC)抗体は Cell Signaling Technology から、抗 MRCKα 抗体は Abcam から、抗 MRCKβ抗体はかずさ DNA 研究所から、抗 FGD5 抗体(ウェスタンブロット用)は Abnova から、rhodamine-phalloidin、Alexa 488 標識ヤギ抗マウスまたはウサギ免疫グロブリン G(immunoglobulin G; IgG)、Alexa 633 標識ヤギ抗マウス IgG は Invitrogen から、西洋ワサビペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase; HRP)標識抗マウスまたはウサギ IgG 抗体は GE Healthcare から購入した。

2-2. 細胞培養・トランスフェクション・small interfering RNA(siRNA)を用いたタンパク質発現抑制

HUVEC は Kurabo から購入し、Fukuhara *et al.*, 2008 (29) に記載されているとおりに培養した。実験は継代 7 回までの細胞を使用した。293T 細胞は 10%牛胎児血清(fetal bovine serum; FBS)および抗生剤(100 μg/mL streptomycin、100 Unit/mL penicillin)を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)培地で 5% CO₂ 存在下、37℃で培養した。HUVEC または 293T 細胞への

トランスフェクションは lipofectamine 2000(Invitrogen)を用いた。siRNA の合成および購入先は以下のとおりである。MHC-IIA および MHC-IIB に対する siRNA(#1: HSS106870 and HSS106873, #2: HSS106872 and HSS106875), Cdc42 siRNA(#1: HSS101666, #2: HSS190761, #3: HSS190760)、FGD5(#1: HSS135807, #2: HSS135806)およびそれらに対するネガティブコントロール siRNA(Cat. No. 12935-200)は Invitrogen から、Rap1A および Rap1B に対する siRNA(#1: J-003623-06-0005 and J-010364-07-0005)(30)およびそれに対するネガティブコントロール siRNA(D-001810-10-05)は Dharmacon から、MRCK siRNA(5'-CGAGAAGACUUUGAAAUA-3')(31)およびそれに対するネガティブコントロール siRNA(SCI-001)は Sigma-Aldrich から購入した。HUVEC への siRNA のトランスフェクションは lipofectamine RNAi MAX reagent(Invitrogen)を用いた。siRNA を導入 24 時間または 48 時間後にコンフルエントとなるように播種し直し、さらに 24 時間培養した後、それぞれの実験を行った。

GFP、MRCK β -GFP、MRCK β H1593/1596A-GFP、Cdc42 または FGD5 を安定発現する HUVECs は *piggyBac* トランスポゾンシステムを利用し、樹立した(32, 33)。継代 5 回目の HUVECs に *piggyBack* transposase をコードするプラスミドとともに目的遺伝子の下流に internal ribosomal entry site(IRES)を挟んで blasticidin 耐性遺伝子をコードするプラスミドを導入し、6 μ g/ml blasticidin 存在下 で 2 週間培養し目的遺伝子を発現する細胞の選別を行った。その後、HUVECs を播種し直し実験に用いた。

2-3. プラスミド

MRCK β をコードするプラスミド(ORK00181)は、かずさ DNA 研究所から購入した。このプラスミドから制限酵素処理によりMRCK β cDNA を切り出し、pEGFP-N1 ベクター(Clontech)のマルチクローニングサイトに挿入することで、C 末端側に緑色蛍光蛋白質(green fluorescent protein; GFP)を付加した MRCK β (MRCK β -GFP)をコードする pEGFP-N1-MRCK β を作成した。さらに pEGFP-N1-MRCK β を鋳型とし、Site-directed mutagenesis kit(Stratagene)を用いて、His1593,1596 を Ala に置換した点変異体(MRCK β H1593/1596A-GFP)をコードする pEGFP-N1-MRCK β

H1593/1596A を作成した。FGD5 をコードするプラスミドは、242-1462 番目のアミノ酸をコードするプラスミドをかずさ DNA 研究所から購入し、このプラスミドから制限酵素処理により FGD5 cDNA(242-1462aa)を切り出し、pEGFP-C1 ベクター(Clontech)のマルチクローニングサイトに挿入したのち、PCR で増幅した FGD5 の N 末端領域(1-241aa)を GFP と FGD5(242-1462aa)の間に組み込み作成した。pEGFP-C1-Cdc42 または pmCherry-Cdc42 は、pCXN2-Cdc42 を鋳型として PCR 法により増幅した Cdc42 を pEGFP-C1 または pmCherry-C1 ベクター(Clontech)に組み込み作成した。siRNA による発現抑制を受けない MRCK β -GFP, MRCK β H1593/1596A-GFP, Cdc42 または FGD5 をコードする cDNA は QuickChange Site-directed mutagenesis kit を用いて作成し、pPBbsr vector にサブクローニングした(32, 33)。pPBbsr vector とともに pERed-NLS-FLAG-Cdc42 WT/G12V/T17N, -RhoA WT/Q63L, -Rac WT/G12V, Ras and interacting protein chimeric unit (Raichu)-RhoA(33)および RaichuEV-Cdc42(34)プラスミドは松田道行先生(京都大学大学院 医学研究科)より供与して頂いた。pERed-NLS-FLAG ベクターは FLAG タグと、IRES を挟んで nuclear localization signal(NLS)シグナルを付加した Express Red 蛍光タンパク質をコードする発現プラスミドである。従って、このベクターが導入された細胞では核が赤色の蛍光で標識される。

2-4. 免疫染色法

細胞免疫染色は Noda *et al.*, 2010(20)と同様に行った。具体的には Cellmatrix type IC を用いてコラーゲンコートしたガラスディッシュ(Asahi Techno Glass)に単層培養した HUVEC を 0.5% 牛血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)(GIBCO, Cat. No. 11020-39)を含んだ medium 199(Invitrogen)に置換し、4 時間飢餓培養した後、溶媒もしくは 10 μ M forskolin, 1 mM 007 または 0.5 mM 6-Bnz を用いて 20 分間刺激した。刺激後、2% ホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline; PBS)を用いて固定した(4°C、30 分間)。抗 Cdc42 抗体を使用するときのみ 10% トリクロロ酢酸を含む蒸留水を用いて固定した(4°C、15 分間)。引き続き、0.05% Triton X-100 を含む PBS を用いて細胞膜を可溶化後(4°C、30 分間)、4% BSA(Sigma-Aldrich, Cat. No. A2153)を含む PBS を用いてブロッッキングを行った(室温、1 時間)。その後、目的のタンパク質に対

する一次抗体とそれに合った Alexa 蛍光標識二次抗体を結合させ観察した。アクチン繊維は rhodamine-phalloidin を用いて観察した。蛍光画像は 60 倍油浸対物レンズ、pE-1 LED 励起システム(CoolLED)および冷却 CCD カメラ(Cool-SNAP-HQ)(Roper Scientific)を備えた Olympus IX-81 倒立蛍光顕微鏡もしくは 60 倍油浸対物レンズを備えた FluoView FV1000 共焦点顕微鏡を用いて取得した。細胞間接着部位のアクチン繊維(rhodamine)、pRLC(Alexa 488)または FGD5(Alexa 488)由来の蛍光強度の定量は MetaMorph software(Molecular Devices)を利用し解析した。具体的には、取得した画像にランダムな直線を引き、その直線に対し3ピクセル幅の平均蛍光強度を測定した。細胞間接着部位を横切る直線で、VE-cadherin(Alexa 633)の蛍光強度がピークとなる点を細胞間接着部位(cell-cell contact)とし、同じ点のアクチン繊維、pRLC または FGD5 の蛍光強度の値をそれぞれの細胞間接着部位の値とした。

2-5. GTP 結合型 Rap1 または RhoA の検出

コラーゲンコートした 60 mm ディッシュに単層培養した HUVEC を 0.5% BSA を含んだ medium 199 に置換し、4 時間飢餓培養した。その後、GTP 結合型 Rap1 の検出時には溶媒、10 μ M forskolin、1 mM 007 または 0.5 mM 6-Bnz を用いて 10 分間刺激した。また GTP 結合型 RhoA の検出時には溶媒または 10 μ M forskolin を用いて 20 分間刺激した。刺激後、可溶化液(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM dithiothreitol, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1×protease inhibitor cocktail(Roche Applied Science, Indianapolis, IN), pH 7.5)を添加し、細胞を可溶化した。可溶化液を回収しボルテックスした後、15,000 rpm、4℃にて 15 分間遠心した。上清の一部を total cellular lysate(TCL)として等量ずつ回収した。残りの上清に GTP 結合型 Rap1 の検出時には RalGDS の Rap1 結合ドメインとグルタチオン S-トランスフェラーゼ(glutathione S-transferase; GST)、また GTP 結合型 RhoA の検出時には rhotekin の Rho 結合ドメインと GST の融合タンパク質が結合したグルタチオン-セファロース 4B ビーズを添加し、4℃で 1 時間攪拌することで、GTP 結合型 Rap1 または GTP 結合型 RhoA を回収した。攪拌後、8,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を除いた後、可溶化液で

ビーズを 3 回洗浄した。その後、適量の 3×SDS バッファー(187.5 mM Tris-HCl, 6% SDS, 30% glycerol, 9% 2-mercaptoethanol, 0.003% bromophenol blue, pH 6.7)を加え、98℃で 4 分間熱処理してウエスタンブロット解析用のサンプルとした。同様に TCL にも 3×SDS バッファーを加え、98℃で 4 分間熱処理してウエスタンブロット解析用のサンプルとした。

2-6. 蛍光ライブイメージング

蛍光共鳴エネルギー転移(fluorescence resonance energy transfer; FRET)の原理に基づいて開発された RhoA バイオセンサーRaichu-RhoA または Cdc42 バイオセンサーRaichuEV-Cdc42 を用いて、生細胞における RhoA または Cdc42 活性の可視化を Sakurai *et al.*, 2006(35) と同様に行った。具体的には Raichu-RhoA または RaichuEV-Cdc42 をコードする DNA プラスミドを HUVEC にトランスフェクションし、8 時間後コンフルエントとなるように播種し直した。翌日、0.5% BSA を含んだ medium 199(フェノールレッド不含)に置換し 1 時間飢餓培養した後、Olympus IX-81 倒立蛍光顕微鏡を用いて 2 分間隔で撮影し、溶媒、10 μ M forskolin または 1mM 007 添加前後の FRET 効率の変化をモニタリングした。画像は保温装置(Tokai Hit)を用いて 37℃、5% CO₂ 存在下で培養しながら取得した。取得した yellow fluorescent protein(YFP)もしくは cyan fluorescent protein(CFP)画像から、MetaMorph software を用いてバックグラウンドを除いた後、FRET 効率(YFP 蛍光/CFP 蛍光)を解析した。その後、forskolin 刺激時の FRET 効率の値を対応する時間の溶媒処理時の FRET 効率の値で割り、補正した後 ratio とした(ratio=(刺激薬処理時の FRET 効率)/(溶媒処理時の FRET 効率))。

GFP 融合タンパク質のイメージングも同様に、0.5% BSA を含んだ medium 199(フェノールレッド不含)に置換し飢餓培養した後、Olympus IX-81 倒立蛍光顕微鏡を用いて行った。画像は保温装置(Tokai Hit)を用いて 37℃、5% CO₂ 存在下で培養しながら取得した。

2-7. 免疫沈降法

図にそれぞれ示したプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に可溶化液(20

mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, 1×protease inhibitor cocktail(Roche Applied Science, Indianapolis, IN), pH 7.5)を添加し、細胞を可溶化した。可溶化液を回収しボルテックスした後、15,000 rpm、4℃にて 15 分間遠心した。上清を TCL として等量ずつ回収した後、残りの上清に抗 FLAG 抗体を添加し、ローテーターを用いて4℃で3時間攪拌した。その後、プロテイン G 結合セファロース4B ビーズを添加し、さらに1時間攪拌した。攪拌後、8,000 rpm で1分間遠心し、上清を除いた。可溶化液を用いてビーズを3回洗浄した後、適量の3×SDS バッファー(187.5 mM Tris-HCl, 6% SDS, 30% glycerol, 9% 2-mercaptoethanol, 0.003% bromophenol blue, pH 6.7)を加え、98℃で7分間熱処理してウエスタンブロット解析用のサンプルとした(IP)。同様に TCL にも3×SDS バッファーを加え、98℃で7分間熱処理してウエスタンブロット解析用のサンプルとした(TCL)。

2-8. 光退色後蛍光回復法

解析はFluoView FV1000を用いてNoda et al., 2010(20)と同様に行った。具体的にはVE-cadherin-GFPをコードしたプラスミドを導入したHUVECsを0.5% BSAを含んだmedium 199に置換し飢餓培養した後、10 μM forskolin刺激を20分間行った。その後、最大出力の405 nmダイオードレーザーを用いて細胞間接着部位の任意の直径13 μmの領域内に存在するGFPを5 秒間かけてほぼ完全に退色させた。その後60秒間隔で約1時間観察し蛍光の回復をモニターした。その後退色前の蛍光強度を基準とし、退色領域の蛍光強度を計算し、Prism5 ソフトウェア(GraphPad Software)を用いてone-phase exponential association へ適合させ、蛍光強度の回復を計算した。

2-9. ECIS によるインピーダンスの測定

ECIS-z0 (Applied Biophysics)を用いた血管内皮細胞バリアの評価は Lo et al., 1999(36)および Pannekoek et al., 2011(37)と同様に行った。具体的にはコラーゲンコートしたプレート(8W10E)に HUVEC を播種し、翌日に 37℃、5% CO₂ 存在下で ECIS-z0 を用いて Rb 値の測定を行った。

2-10. 血管透過性アッセイ

蛍光色素を用いた HUVECs の細胞間隙の透過性の測定は Fukuhara et al., 2005(10)と同様に行った。具体的にはコラーゲンコートしたトランスウェル ユニットの upper chamber (6.5-mm diameter, 3.0- μ m-pore-size polycarbonate filter; Corning Costar Corporation, Cambridge, MA)に 10^5 個の HUVECs を播種し、3 日間培養した。その後、溶媒または 20 μ M blebbistatin を用いて 4 時間処理したのち、溶媒または 10 μ M forskolin を用いて 30 分間刺激した。MRCK の発現抑制時には、HUVECs に siRNA を導入した 24 時間後に upper chamber に播種し直した。さらに 24 時間培養したのち、溶媒または 10 μ M forskolin を用いて 30 分間刺激した。その後、upper chamber の培地を 1 mg/ml FITC 標識デキストラン(分子量 3,000)を含む培地に置換し、30 分後に lower chamber に移行した FITC 標識デキストラン量を蛍光分光光度計(Hitachi)を用いて測定した。

2-11. 統計

実験結果は平均値 \pm 標準誤差(S.E.M.)で示した。有意差検定には 2 群間の比較には Student's *t*-test を、多重比較には Turkey's test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

第三章 実験結果

3-1. Myosin II が cAMP-Epac-Rap1 による CAB 形成に必要である。

培養内皮細胞 HUVEC をコラーゲンコートしたガラスディッシュに播種すると、細胞内を横断するアクチン繊維(stress fiber)が発達し、断片的な VE-cadherin 接着となり、弱い内皮細胞間接着が形成される(Fig. 3 A 左)。一方、adenylyl cyclase の活性化を介して cAMP 産生を亢進させる forskolin 刺激を行うと、バリアの減弱を引き起こす stress fiber が消失するとともに細胞間接着部位に並走するアクチン繊維(CAB)が発達する(Fig. 3 A 右)。まず cAMP-Epac-Rap1 による内皮細胞間接着部位におけるアクチン繊維(CAB)の形成に対する myosin II の関与を明らかにするため、Rap1 による CAB 形成時に myosin II が活性化されるか調べた。Myosin II はその調節軽鎖の Ser19 のリン酸化により活性化されることから(21)、myosin II の活性化の指標として調節軽鎖の Ser19 のリン酸化部位を免疫染色法により調べた(以後、myosin II を構成する調節軽鎖を単に調節軽鎖と呼ぶ)。調節軽鎖の Ser19 のリン酸化を観察すると、非刺激下では調節軽鎖の Ser19 のリン酸化は細胞内を横断する stress fiber 上に観察されるが(Fig. 3 E. 片括弧)、細胞間接着部位のアクチン繊維は細く、調節軽鎖の Ser19 のリン酸化も観察できなかった(Fig. 3 E. 矢頭)。しかし、forskolin 刺激または Epac 特異的活性化剤である 007 刺激により、stress fiber が消失する一方で、細胞間接着部位に CAB が形成され、CAB 上に調節軽鎖の Ser19 のリン酸化が観察された(Fig. 3 B-E. 3 E 矢頭)。

一方、cAMP は Epac に加え protein kinase A の活性化も惹起するが、protein kinase A の活性化剤である 6-Bnz 刺激により、protein kinase A の活性化の指標である CREB の Ser133 のリン酸化の亢進が認められるものの、stress fiber の消失および CAB の発達は見られず、調節軽鎖の Ser19 のリン酸化にも変動が認められなかった(Fig. 3 B-E.)。さらに Rap1 の関与を調べるため siRNA による Rap1 の発現抑制を行ったところ、Rap1 の発現抑制により forskolin および 007 刺激による stress fiber の消失および CAB の発達が阻害されると共に、細胞間接着部位での調節軽鎖の Ser19 のリン酸化も観察されなかった(Fig. 3 F, G)。これらの結果から、cAMP-Epac-Rap1 は stress fiber を消失し、CAB 形成を誘導するとともに CAB 上で myosin II の活性化を惹起することが明らかになった。

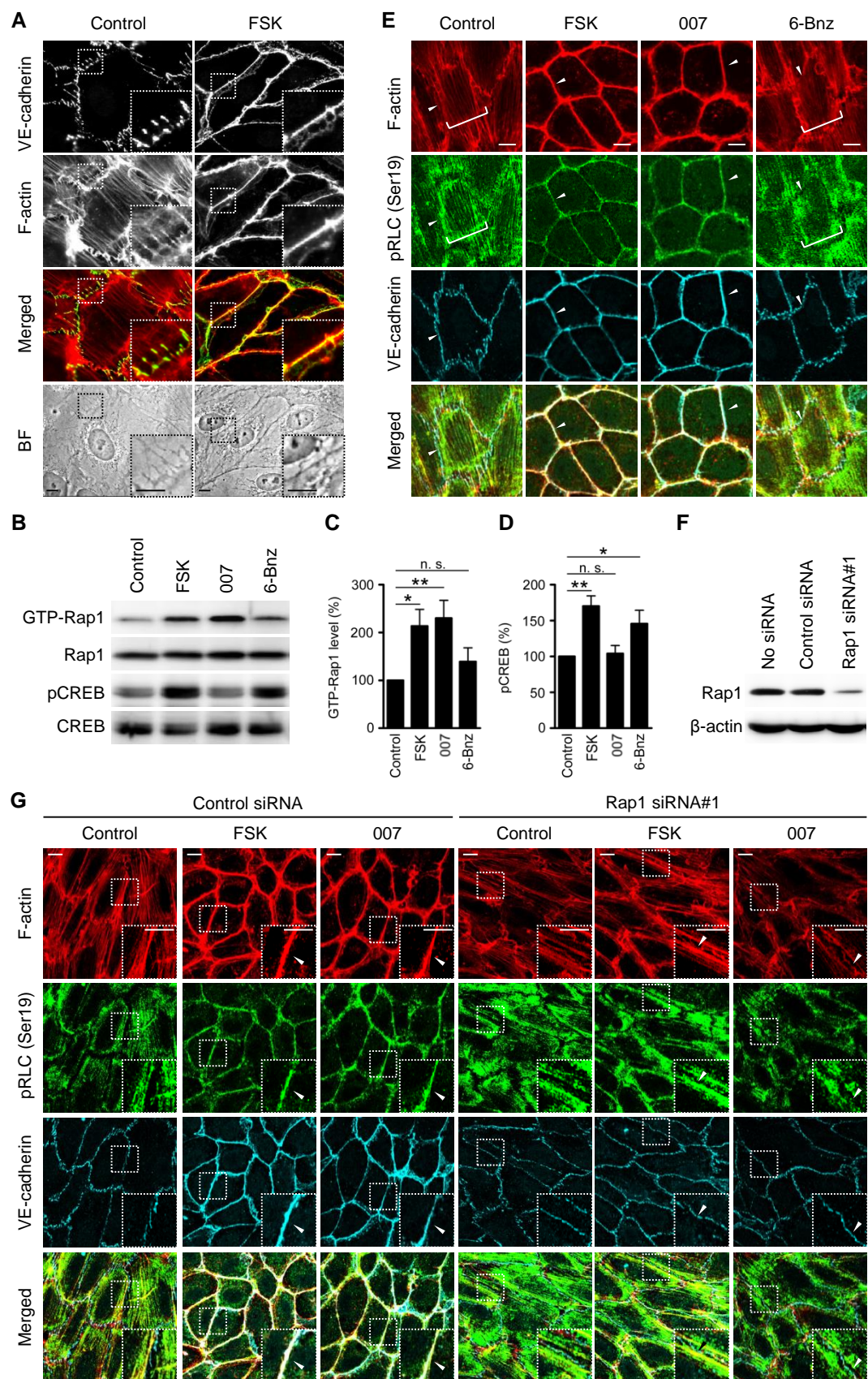


Figure 3. Rap1 induces phosphorylation of RLC and formation of CAB at cell-cell contacts.

(A) Monolayer-cultured HUVECs plated on collagen-coated dish were stimulated with vehicle (Control) or 10 μ M forskolin (FSK) for 20 min, and immunostained with anti-VE-cadherin antibody and stained with rhodamine-phalloidin (F-actin). VE-cadherin and F-actin images, the merged images (VE-cadherin: green, F-actin: red), and the bright field (BF) images are shown. (B) Levels of GTP-bound form of Rap1 (GTP-Rap1), total Rap1 (Rap1), phosphorylated CREB (pCREB) and total CREB (CREB) in the HUVECs stimulated with vehicle (Control), 10 μ M forskolin, 1 mM 007 or 0.5 mM 6-Bnz. (The cells were stimulated with forskolin, 007 and 6-Bnz at these concentrations for 20 min throughout the following experiments unless otherwise indicated.) (C, D) Levels of GTP-Rap1 (C) and pCREB (D) observed in B were quantified. Values are expressed as a percentage relative to that observed in the cells stimulated with vehicle (Control), and shown as mean \pm s.e.m. from 10 independent experiments. (E) HUVECs were stimulated with vehicle (Control), forskolin, 007 or 6-Bnz, and stained with rhodamine-phalloidin (F-actin) and immunostained with anti-pRLC (phosphorylated regulatory myosin light chain) at Ser19 (pRLC (Ser19)) and anti-VE-cadherin antibodies. F-actin, pRLC (Ser19), VE-cadherin images, and the merged images are shown. (F) Lysates from the HUVECs transfected without (No siRNA) or with control siRNA or Rap1 siRNA#1 for 3 d were subjected to Western blot analyses with anti-Rap1 and anti- β -actin antibodies. (G) HUVECs transfected with control siRNA or Rap1 siRNA#1 were stimulated with vehicle (Control), forskolin or 007, and stained similar to B. In A and G, the boxed areas are enlarged in the bottom right corner of each image. Arrowheads (E, G) and parentheses (E) indicate cell-cell junctions and stress fibers, respectively. Scale bars, 20 μ m.

次に cAMP-Epac-Rap1 による CAB 形成に対する myosin II の関与を確かめるため、siRNA を用いて myosin II の発現抑制を行い検討した。上皮細胞において adherence junction の形成に対する関与が明らかにされている myosin IIA および IIB(27)を構成する myosin II 重鎖 A(MHC-IIA)、B(MHC-IIB)の発現抑制を行なったところ、非刺激下における stress fiber の形成および forskolin 刺激による CAB 形成が阻害された(Fig. 4 A, B)。同様に、myosin II 特異的阻害剤である blebbistatin によっても、非刺激下における stress fiber の形成に加え、forskolin および 007 刺激による CAB 形成が阻害された(Fig. 4 C, D)。これらの結果から、Rap1 は細胞間接着部位にて myosin II の活性化を惹起し CAB 形成を促進することが分かった。加えて、myosin II が stress fiber の形成にも同様に寄与することが示唆された。

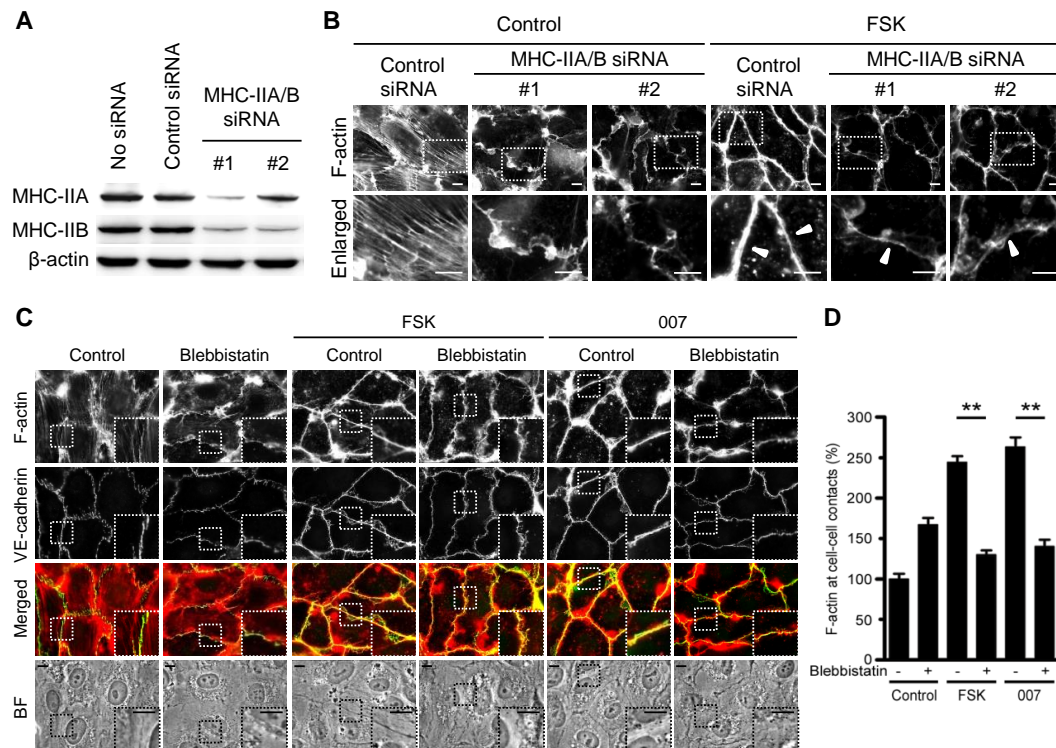


Figure 4. Myosin II is required for Rap1-induced CAB formation. (A) Knockdown efficiency of two sets of siRNA mixtures for NM-IIA and NM-IIB (#1 and #2) was analyzed similar to Fig. 3 B. (B) HUVECs transfected with siRNA indicated at the left (control or two independent mixtures, #1 and #2, of MHC-IIA and MHC-IIB) were stimulated with vehicle (Control) or forskolin, and stained with rhodamine-phalloidin. (C) HUVECs were pretreated without or with 20 μ M blebbistatin for 4 h, stimulated with vehicle, forskolin or 007 and stained similar to Fig. 3 A. (D) F-actin accumulated at cell-cell contacts observed in C was quantified. Values are expressed as a percentage relative to that in the blebbistatin-untreated cells stimulated with vehicle, and shown as mean \pm s.e.m. from three independent experiments ($n \geq 80$). $**p < 0.01$, significant difference between two groups. In B and C, the boxed areas are enlarged at the bottom of the original images (B), or in the bottom right corner of each image (C). Arrowheads in B indicate CAB at cell-cell junctions. Scale bars, 20 μ m.

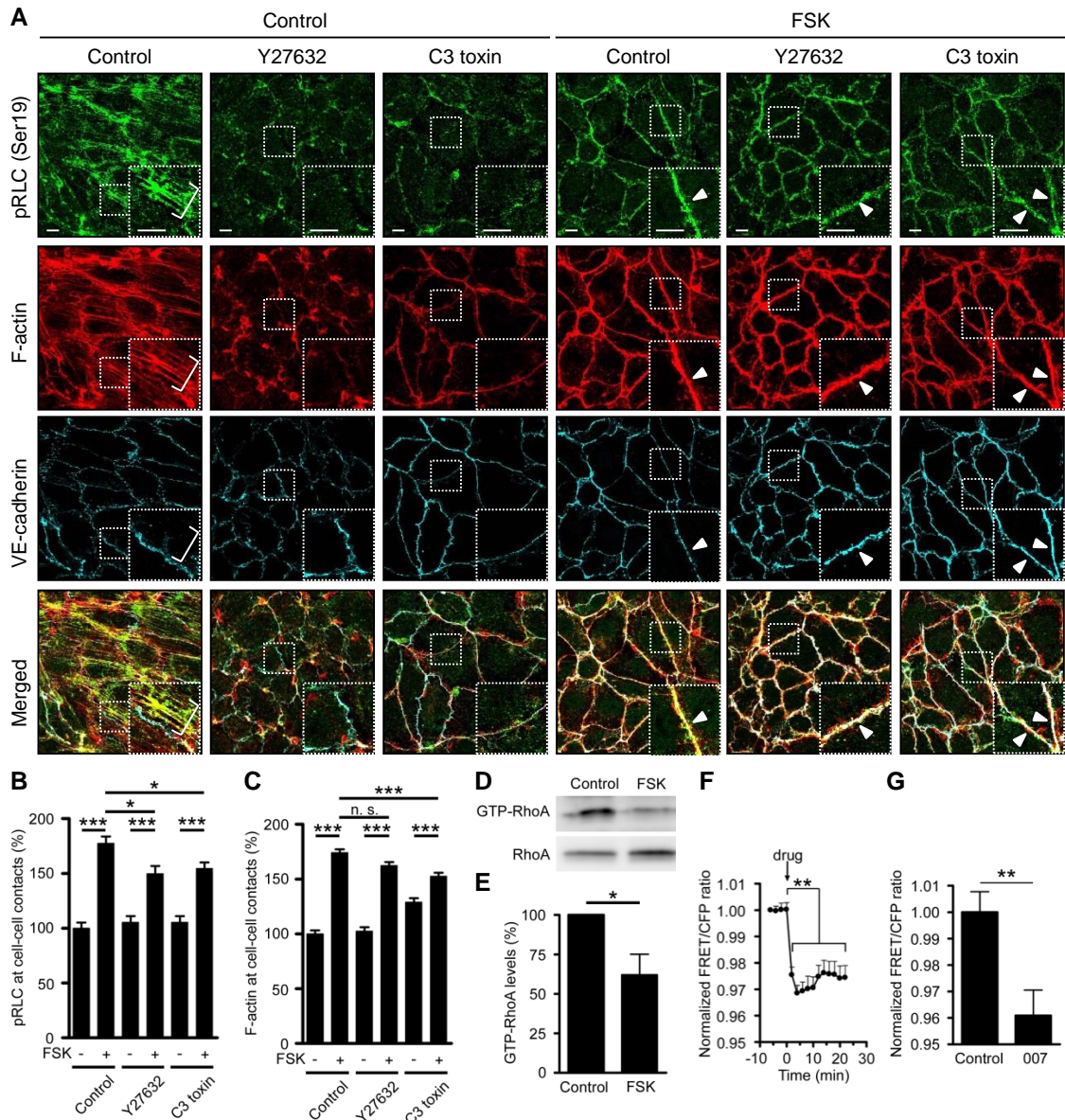
3-2. Rho-ROCK を介した myosin II の活性化は stress fiber の形成に必須だが、CAB 形成には関与しない。

次に、cAMP-Epac-Rap1 による CAB 形成時における myosin II の活性化機構の解明を試みた。低分子量 G タンパク質 Rho のエフェクターである、調節軽鎖リン酸化酵素 ROCK(Rho-associated coiled-coil containing protein kinase)は、上皮細胞(27)および内皮細胞(28, 38)において adherence junction の制御に関わることが報告されている。そこで、cAMP-Epac-Rap1 による CAB 形成に対する Rho-ROCK シグナルの関与を、ROCK 阻害薬である Y27632 および Rho 阻害薬である C3 toxin を用いて確かめた。その結果、Y27632 および C3 toxin により非刺激下での stress fiber の消失が観察された(Fig. 5 A-C)。一方で、forskolin 刺激による CAB 上の調節軽鎖の Ser19 のリン酸化および CAB 形成は、Y27632 および C3 toxin によりほとんど阻害されなかった(Fig. 5 A-C)。これらの結果から、Rho-ROCK-myosin II 経路は stress fiber の形成に必須であるものの、予想とは異なり cAMP-Epac-Rap1 による細胞間接着部位における myosin II の活性化とそれに引き続く CAB 形成にはほぼ関与しないことが分かった。

一方、Rho-ROCK-myosin II 経路の阻害または Rap1 の活性化により stress fiber の消失が観察されることから、Rap1 は Rho 経路の抑制を介して stress fiber の消失を引き起こすと考えられた。そこで Rho 活性を測定したところ、forskolin 刺激または 007 刺激により RhoA の不活性化が確認された(Fig. 5 D-G)。これらの結果から、Rap1 は Rho-ROCK 依存的な myosin II の活性化を抑制し内皮細胞間接着の減弱に関わる stress fiber を消失させる一方、新たに ROCK 以外のキナーゼにより myosin II の活性化を惹起し CAB 形成を促進することが示唆された。

Figure 5. The Rho-ROCK-NM-II pathway is required for stress fiber formation, but not for CAB formation. (A) Monolayer-cultured HUVECs were treated without (Control) or with either 10 $\mu\text{g/ml}$ C3 toxin for 24 h or 50 μM Y27632 for 30 min, stimulated with vehicle (Control) or forskolin, and stained similar to Fig. 3 B. The boxed areas are enlarged in the bottom right corner of each image. Arrowheads and parentheses indicate cell-cell junctions and stress fibers, respectively. Scale bars, 20 μm . (B, C) Quantitative relative expression values of pRLC at Ser19 (B) and F-actin (C) at cell-cell contacts to that in the control cells without forskolin stimulation observed in A are shown as mean \pm s.e.m. from three independent experiments ($n \geq 209$). (D, E) GTP-bound form of RhoA

(GTP-RhoA) and total RhoA (RhoA) in the HUVECs stimulated with vehicle (Control) or forskolin for 20 min were analyzed. In E, values are expressed as a percentage relative to that in control cells, and shown as mean \pm s.e.m. ($n \geq 7$). (F) HUVECs expressing Raichu-RhoA, a FRET-based RhoA activity-monitoring probe, were stimulated with vehicle or forskolin and subjected to time-lapse FRET imaging. The images were obtained every 2 min for 10 min before and 50 min after the stimulation. The normalized FRET/CFP ratio was calculated by dividing the FRET/CFP ratio in the cells stimulated with forskolin by those in the vehicle-treated cells at the corresponding time points. The drugs were added to the culture media at time 0 as indicated by arrow. Data are expressed as fold increase relative to that at time -6 min, and shown as mean \pm s.e.m. of 10 independent experiments. (G) Raichu-RhoA-expressing HUVECs were stimulated with vehicle (Control) or 007, and subjected to time-lapse FRET imaging. The fold increase in FRET/CFP ratios approximately 15 min after the stimulation were calculated and shown as mean \pm s.e.m. ($n \geq 89$). In B, C, E, F and G, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, significant difference between two groups. n.s., no significance between two groups.



3-3. MRCK を介して cAMP-Epac-Rap1 は細胞間接着部位における myosin II の活性化および CAB 形成を促進する

引き続き、cAMP-Epac-Rap1 による CAB 形成時における myosin II の活性化機構の解明を試みた。myosin II は調節軽鎖の Ser19 の 1 重リン酸化に加え Thr18/Ser19 の 2 重リン酸化を受けることによっても活性化される。これまで調節軽鎖をリン酸化する酵素は ROCK 以外にもいくつか同定されているが、リン酸化酵素の種類によって Ser19 のみをリン酸化するか、あるいは Thr18/Ser19 の 2 重リン酸化を惹起するかは異なる(21)。そこで cAMP-Epac-Rap1 による CAB 形成時における myosin II の活性化機構を解く手がかりを得るために、これまでの調節軽鎖の Ser19 のリン酸化に加え、Thr18/Ser19 の 2 重リン酸化について調べた。その結果、stress fiber 上では Ser19 の 1 重リン酸化および Thr18/Ser19 の 2 重リン酸化が観察されるものの、CAB 上では Thr18/Ser19 の二重リン酸化はほとんど惹起されていなかった(Fig. 6 A)。この結果は、Thr18/Ser19 の 2 重リン酸化を惹起せず Ser19 の 1 重リン酸化のみを惹起するリン酸化酵素が、cAMP-Epac-Rap1 による CAB 形成に関与することを意味する。

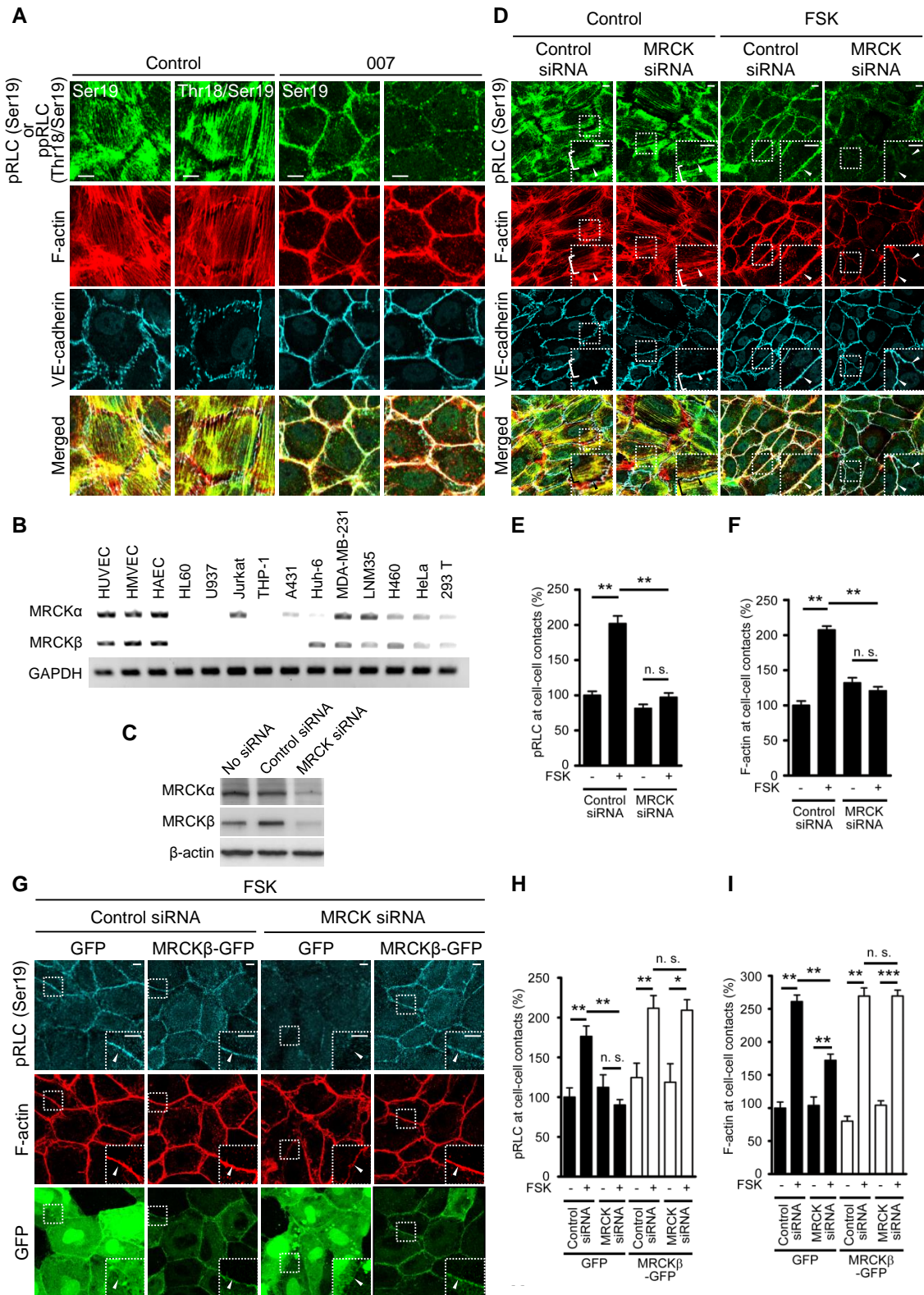
その候補として p21-activated kinases または MRCK(myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase)が挙げられる(39-41)。このうち p21-activated kinases は内皮細胞バリアの減弱に関与することが、これまでに報告されている(42-44)。一方、内皮細胞における MRCK の役割に関する報告はないことから、次に MRCK に着目し解析を続けた。MRCK の関与を調べるため、まずこれまで明らかにされていなかった内皮細胞における MRCK の発現の有無を調べた。RT-PCR 法を用いて、報告がある 3 種類(α , β , γ)のアイソフォームのうち MRCK α および β について解析を行った結果、解析したすべての内皮細胞(HUVEC、HMVEC、HAEC)において、MRCK α および β の発現が認められた(Fig. 6 B)。さらに HUVEC において MRCK α および β のタンパク質レベルでの発現も確認できた(Fig. 6 C)。

次に機能的なMRCKの関与を明らかにするために、siRNAによりMRCKの発現抑制を行い検討した。MRCK α 、 β の両方を標的にするsiRNAを用いて両者の発現を抑制したところ、非刺激下の stress fiberの形成およびstress fiber上の調節軽鎖のSer19のリン酸化は阻害されないものの、

forskolin刺激および007刺激によるCAB上の調節軽鎖のSer19のリン酸化は著しく阻害された(Fig. 6 C-F)。この時のCABは断裂している箇所もあり、また全体的にアクチン繊維は細く、堅固なCABは形成されなかった。さらに、MRCK α と β の発現抑制によるCAB上での調節軽鎖のSer19のリン酸化およびCAB形成の阻害は、siRNAによる発現抑制を受けないMRCK β をコードするプラスミドを導入することによりレスキューされた(Fig. 6 G-I)。これらの結果からMRCKがcAMP-Epac-Rap1による細胞間接着部位におけるmyosin IIの活性化と、それに引き続くCAB形成に必須であることが明らかになった。また、MRCK α または β それぞれの発現抑制を行なった場合ではCAB形成阻害効果が両方の発現抑制を行った場合よりも弱いこと、およびMRCK $\alpha\beta$ の発現抑制による阻害効果がMRCK β の過剰発現によりレスキューされた(未公表)ことから、cAMP-Epac-Rap1によるCAB形成時におけるmyosin IIの活性化に対し、MRCK α と β は重複した機能を持つと考えられる。

Figure 6. MRCK is required for Rap1-induced NM-II activation leading to CAB formation.

(A) HUVECs were stimulated with vehicle (Control) or 007, and stained similar to Fig. 3 E. pRLC (Ser19) or ppRLC (Thr18/Ser19) images, F-actin images and the merged images (pRLC (Ser19) or ppRLC (Thr18/Ser19): green, F-actin: red) are shown. (B) Expression of MRCK α , MRCK β and GAPDH mRNA in the endothelial cells (ECs) (human umbilical vein EC (HUVEC), human microvascular EC (HMVEC), human arterial EC (HAEC)) and in the non-ECs (HL60, U937, Jurkat, THP-1, A431, Huh-6, MDA-MB-231, LNM35, H460, Hela and 293T) was analyzed by RT-PCR analysis. (C) Lysates from the HUVECs transfected without (No siRNA) or with control siRNA or MRCK siRNA targeting both MRCK α and MRCK β for 2 d were subjected to Western blot analyses with anti-MRCK α , anti-MRCK β and anti- β -actin antibodies. (D) HUVECs transfected with control or MRCK siRNA were stimulated with vehicle (Control) or forskolin, and stained similar to Fig. 3 E. (E, F) Quantitative relative expression values of pRLC at Ser19 (E) and F-actin (F) at cell-cell contacts to that in control siRNA-transfected cells without forskolin stimulation observed in D were expressed as mean \pm s.e.m. ($n \geq 40$). Similar results were obtained in three independent experiments. (G) HUVECs expressing either GFP or siRNA-insensitive MRCK β -GFP were transfected with control or MRCK siRNA, stimulated with forskolin, and immunostained with anti-pRLC at Ser19 (pRLC (Ser19)) antibody and stained with rhodamine-phalloidin (F-actin). pRLC (Ser19), F-actin and GFP images are shown. Note that GFP signal at cell-cell contacts between the cells expressing GFP is ascribed to the overlap of plasma membrane. (H, I) Quantitative relative expression value of pRLC at Ser19 (H) and F-actin (I) at cell-cell contacts to that in GFP-expressing and control siRNA-transfected cells without forskolin stimulation observed in G are as mean \pm s.e.m. ($n \geq 40$). Similar results were obtained in three independent experiments. In A, D, and G, the boxed areas are enlarged in the bottom right corner of each image. Arrowheads (D, G) and parentheses (D) indicate cell-cell junctions and stress fibers, respectively. Scale bars, 20 μ m (A, D, G). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant difference between two groups. n.s., no significance between two groups.



3-4. cAMP-Epac-Rap1はCdc42依存的にMRCKを細胞間接着部位へ移行させる

次にcAMP-Epac-Rap1による細胞間接着部位でのmyosin IIの活性化機構を解くために、MRCKの局在を観察した。MRCK β にGFPを融合させ(MRCK β WT-GFP)、その局在を観察したところ、非刺激下では主に細胞質内に局在するものの、forskolin刺激(Fig. 7 A)または007刺激(未公表)により細胞間接着部位へ移行する様子が観察された。一方、forskolin刺激によるMRCK β WT-GFPの細胞間接着部位への移行は、Rap1の発現抑制により阻害された(Fig. 7 B)。この結果からcAMP-Epac-Rap1は細胞間接着部位へMRCKを移行させることが分かった。

そこで次にcAMP-Epac-Rap1はどのようにしてMRCKを細胞間接着部位へ移行させるのか、そのメカニズムを明らかにしようと試みた。MRCKはCdc42のエフェクターとして知られているが(39)、実際にMRCKとRhoファミリー低分子量Gタンパク質であるCdc42、RhoAおよびRac1との相互作用を免疫共沈降法により検討したところ、確かに優性活性化変異体のCdc42(Cdc42 G12V)のみMRCK β との相互作用が確認され、RhoAやRac1との相互作用は確認できなかった(Fig. 7 C)。このことから、MRCKはCdc42により細胞間接着部位への移行が制御されていると考えた。この仮説を検証するためにsiRNAを用いてCdc42の発現抑制を行うと、forskolin刺激によるMRCK β WT-GFPの細胞間接着部位への移行が阻害された(Fig. 7 D)。加えて、MRCK β WT-GFPはforskolin刺激により細胞間接着部位へ移行しCAB上に局在するものの、Cdc42と結合しない変異体MRCK β H1593/1596A-GFPではCAB上への移行が観察されなかった(未公表)。同様に、007刺激によりMRCK β WT-GFPは細胞間接着部位へ移行するものの、MRCK β H1593/1596A-GFPは細胞間接着部位への移行が観察されなかった(Fig. 7 E)。これらの結果から、cAMP-Epac-Rap1はCdc42を介してMRCKを細胞間接着部位へ移行させることが示唆された。従って、cAMP-Epac-Rap1はCdc42依存的にMRCKを細胞間接着部位に移行させmyosin IIの活性化を惹起することで、効率的に細胞間接着部位にてCAB形成を促進するものと考えられた。

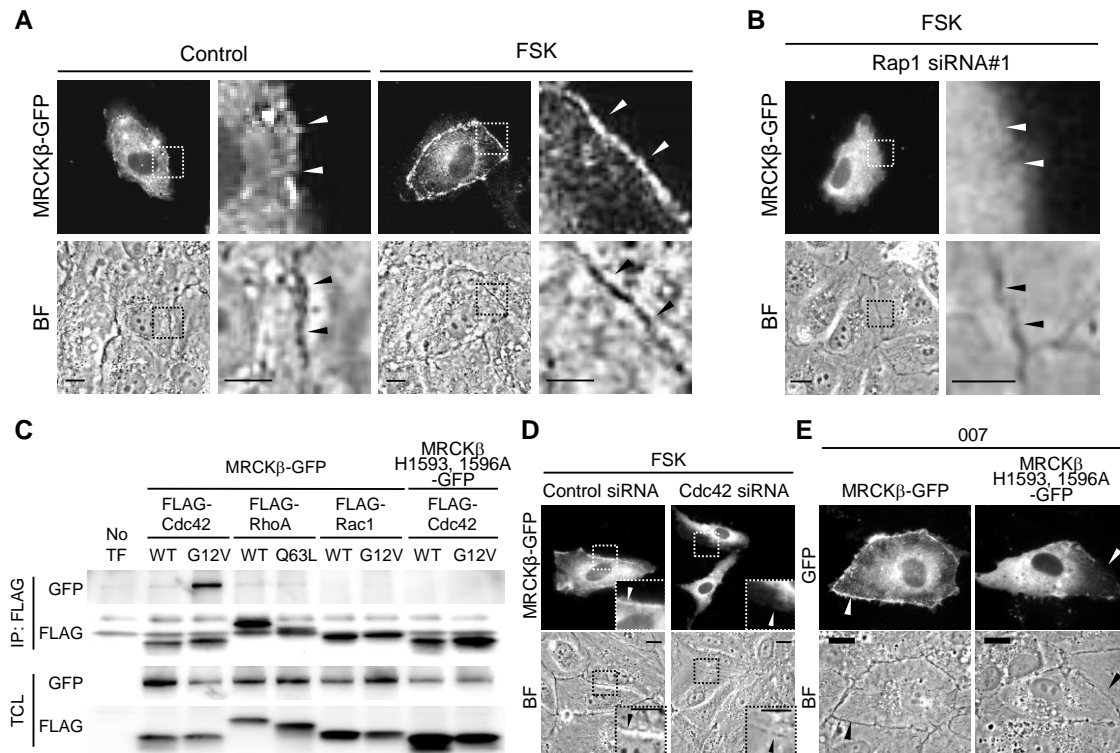


Figure 7. Rap1-dependent translocation of MRCK to cell-cell junctions is mediated by Cdc42.

(A) HUVECs transfected with the plasmid encoding MRCKβ-GFP were stimulated with vehicle (Control) or forskolin. GFP (MRCKβ-GFP) and bright field (BF) images are shown. The boxed areas are enlarged on the right side of the original images. (B) HUVECs transfected with the plasmid encoding MRCKβ-GFP together with Rap1 siRNA#1 were stimulated with forskolin similar to A. (C) 293T cells were transfected with the plasmid encoding either MRCKβ-GFP or MRCKβ H1593/1596A-GFP together with the vector expressing either FLAG-tagged wild type or constitutive active mutant of Cdc42 (Cdc42 WT and Cdc42 G12V), RhoA (RhoA WT and RhoA Q63L) and Rac1 (Rac1 WT and Rac1 G12V) as indicated at the top. Immunoprecipitates (IP: FLAG) of cell lysates and aliquots of total cell lysates (TCL) were subjected to Western blot analyses with anti-GFP and anti-FLAG antibodies as indicated at the left. (D) HUVECs transfected with either control siRNA or Cdc42 siRNA for 48 h were subsequently transfected with the vector encoding MRCKβ-GFP for 24 h, and stimulated with forskolin similar to A. The boxed areas are enlarged in the bottom right corner of each image. (E) HUVECs transfected with the plasmid encoding either MRCKβ-GFP or MRCKβ H1593/1596A-GFP were stimulated with 007 similar to A. In A, B, D and E, arrowheads indicate cell-cell junctions. Scale bars, 20 μm (A, B, D) and 30 μm (E).

3-5. cAMP-Epac-Rap1は細胞間接着部位において活性化型Cdc42を蓄積させ、MRCKの局在を制御する

では、どのようにしてcAMP-Epac-Rap1はCdc42を介してMRCKを細胞間接着部位へ移行させるのか、次にこの機構を明らかにしようと試みた。Cdc42と結合しない変異体MRCK β H1593/1596A-GFPでは細胞間接着部位への移行が観察されなかったことから(Fig. 7 E)、Rap1は活性化型のCdc42を細胞間接着部位にて増加させることにより細胞間接着部位へMRCKを局在化させると予想した。これを確かめるため、活性化型Cdc42の局在を調べた。活性化型Cdc42と特異的に結合するN-WASPのCRIBドメインにGFPを融合し(GFP-N-WASP WT)、その局在を観察することにより疑似的に活性化型Cdc42の局在を観察できる実験系を用いて検討した。その結果、007刺激によりGFP-N-WASP WTが細胞間接着部位に蓄積する様子が観察された(Fig. 8 A)。一方、Cdc42との結合を阻害したN-WASP変異体であるGFP-N-WASP H211Dでは007刺激を行っても細胞間接着部位へ移行しなかった(Fig. 8 A)。また、007刺激によるGFP-N-WASP WTの細胞間接着部位への移行は、Rap1の発現抑制により阻害された(Fig. 8 A)。これらの結果から、cAMP-Epac-Rap1は細胞間接着部位において活性化型Cdc42を増加させることが示唆された。

次に、細胞間接着部位における活性化型Cdc42を増加させる機構を解くためCdc42の局在と活性変化を観察した。まずCdc42の局在を観察すると、forskolin刺激によりCdc42が細胞間接着部位へ移行することが分かった(Fig. 8 B, C)。加えて、mCherryを融合したCdc42も細胞間接着部位に移行しMRCK β WT-GFPと共局在した(Fig. 8 D)。次に、Cdc42の活性変化を可視化できるFRETバイオセンサーRaichuEV-Cdc42を用いて、Cdc42の活性化部位を解析した。その結果、forskolinおよび007刺激により細胞間接着部位を含む細胞辺縁部においてCdc42が活性化されることが分かった(Fig. 8 E, F)。これらの結果から、Rap1はCdc42を細胞間接着部位に移行させ、さらに移行したCdc42を活性化することで細胞間接着部位における活性化型のCdc42を増加させることが分かった。また、細胞内全体でCdc42の活性化を誘導するとMRCK β WT-GFPは細胞膜全体に局在した(未公開)。従って、cAMP-Epac-Rap1は細胞間接着部位において活性化型のCdc42を増加させることにより、活性化型のCdc42と相互作用するMRCKを細胞間接着部位へ移行させると考えられる。

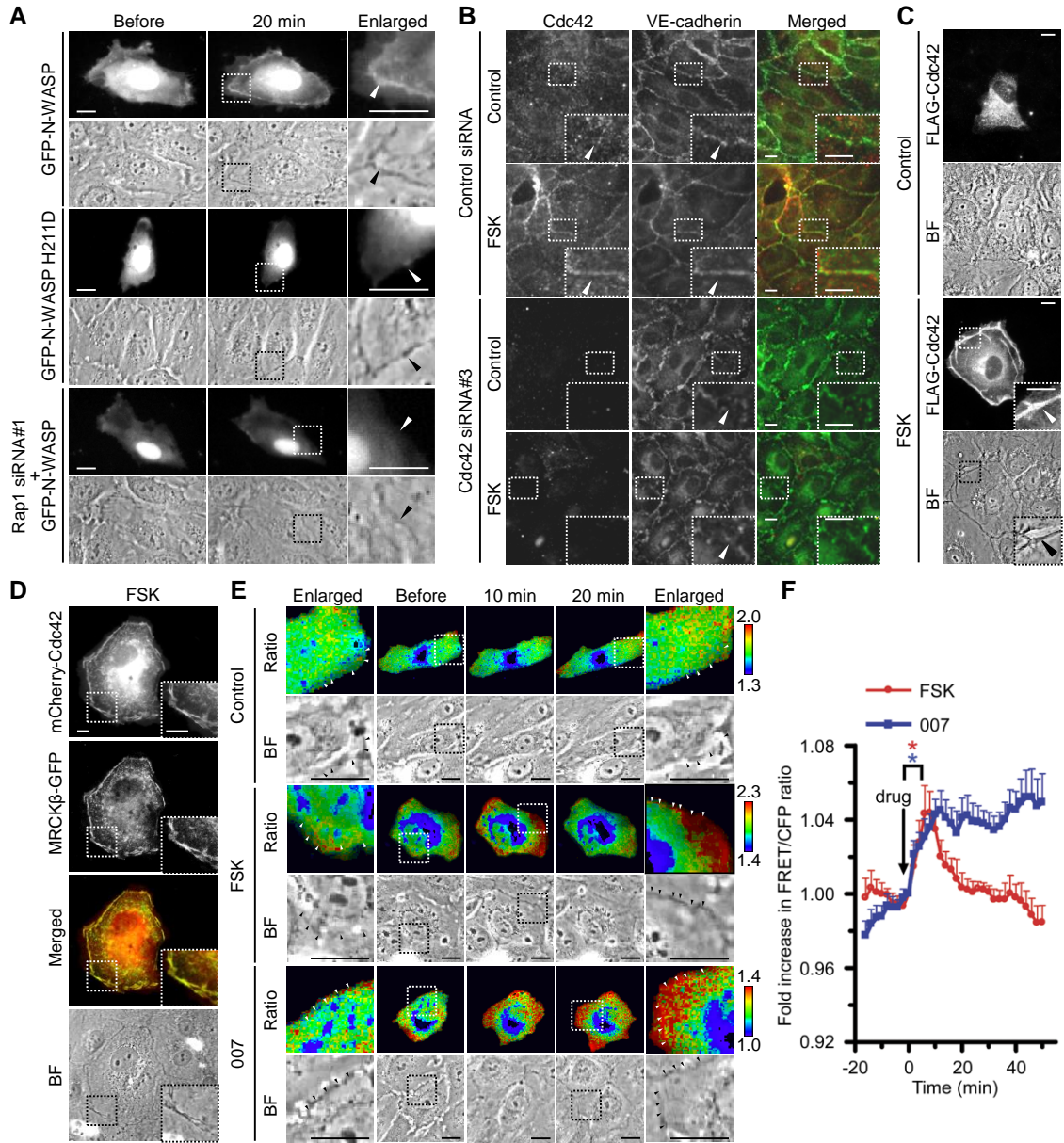


Figure 8. Rap1 induces accumulation of active Cdc42 at cell-cell junctions. (A) HUVECs transfected either with the N-WASP-expressing plasmids indicated at the left; GFP-tagged CRIB domain of N-WASP (GFP-N-WASP) or the mutant lacking Cdc42 binding site (GFP-N-WASP H211D) were stimulated with 007. The cells transfected with the plasmid encoding GFP-N-WASP together with Rap1 siRNA#1 were also stimulated with 007 (lower two rows). GFP and bright field (BF) images acquired before and 20 min after the stimulation are shown. (B) HUVECs transfected with either control siRNA or Cdc42 siRNA#3 were stimulated with vehicle (Control) or forskolin and immunostained with anti-Cdc42 and anti-VE-cadherin antibodies. Images of Cdc42 and VE-cadherin and the merged images (Cdc42: red, VE-cadherin: green) are shown. (C) HUVECs transfected with the plasmid expressing FLAG-Cdc42 were stimulated with either vehicle (Control) or forskolin and immunostained with anti-FLAG antibody. FLAG-Cdc42 and bright field (BF) images are shown. (D) HUVECs cotransfected with the plasmid encoding mCherry-Cdc42 and that encoding MRCKβ-GFP were stimulated with forskolin. mCherry (mCherry-Cdc42) and GFP (MRCKβ-GFP) images, the merged images (mCherry: red, GFP: green) and the bright field (BF) images are shown. (E) HUVECs expressing RaichuEV-Cdc42, a FRET-based Cdc42

activity-monitoring probe, were stimulated with vehicle (Control), forskolin or 007 and subjected to time-lapse FRET imaging. The images were obtained every 2 min for 16 min before and 50 min after the stimulation. Representative ratio images of FRET/CFP at the indicated time points are shown in the intensity-modulated display mode (IMD). The upper and lower limits of the ratio image with IMD are indicated on the right. The boxed areas in the images acquired before and after the stimulation are enlarged on the left and right sides of the original images, respectively. (F) The fold increase of the FRET/CFP ratio observed in E was calculated by dividing the FRET/CFP ratio in the cells stimulated with either forskolin (red line) or 007 (blue line) by those in the vehicle-treated cells at the corresponding time points. The drugs were added to the culture media at time 0 as indicated by arrow. Data are expressed as fold increase relative to that at time 0, and shown as mean \pm s.e.m. of seven independent experiments. Significant differences between the value at 0 min and that at 8 min after the stimulation are indicated as $*p < 0.05$. The boxed areas are enlarged on the right side of the original images (A) or in the bottom right corner of each image (B, C, D). In A, B, C and E, arrowheads indicate cell-cell junctions. Scale bars, 20 μ m (A) and 30 μ m (B-E).

3-6. cAMP-Epac-Rap1はCdc42-MRCKを介して細胞間接着部位におけるmyosin IIの活性化およびCABの形成を促進する

次にCdc42によるMRCKの細胞間接着部位への移行がcAMP-Epac-Rap1による細胞間接着部位におけるmyosin IIの活性化およびCAB形成に関与するのか確かめるために、まずsiRNAを用いたCdc42の発現抑制実験を行った。その結果、Cdc42の発現抑制により、非刺激下のstress fiberの形成およびstress fiber上の調節軽鎖のSer19のリン酸化は阻害されないものの、forskolinおよび007刺激による細胞間接着部位における調節軽鎖のSer19のリン酸化およびCAB形成は著しく阻害された(Fig. 9 A, B)。またCdc42の発現抑制によるCAB形成の阻害効果は、siRNAにより発現抑制を受けないCdc42をコードするプラスミドを導入することによりレスキューされた(Fig. 9 C)。異なる配列を認識するさらに2種類のCdc42に対するsiRNA(Fig. 9 A, D)またはCdc42の優性劣性変異体(Cdc42 T17N)(Fig. 9 E)を導入することによりCdc42の機能阻害を行った場合も、forskolin刺激によるCAB形成が同様に阻害された。さらにCdc42と結合できない変異体であるMRCK β H1593/1596Aを用いて、MRCKの発現抑制によるCAB形成に対する阻害効果がレスキューされるか検証した。その結果、MRCK β H1593/1596A-GFPでは、siRNAによるCAB形成に対する阻害効果はレスキュー出来なかった(Fig. 9 F)。予想外にも、MRCK β H1593/1596A-GFPを過剰発現させると細胞間接着部位での調節軽鎖のリン酸化およびCAB形成が阻害された。MRCK α は多量体を形成することが報告されていることから、この結果はおそらくMRCK β H1593/1596A-GFPが内因性のMRCKと多量体を形成することにより内因性のMRCKの機能を阻害したためだと思われる。

以上の結果から、cAMP-Epac-Rap1は細胞間接着部位において活性化型のCdc42を増加させ、MRCKを細胞間接着部位へ移行させることによりmyosin IIの活性化をもたらし、CAB形成を促進することが明らかになった。

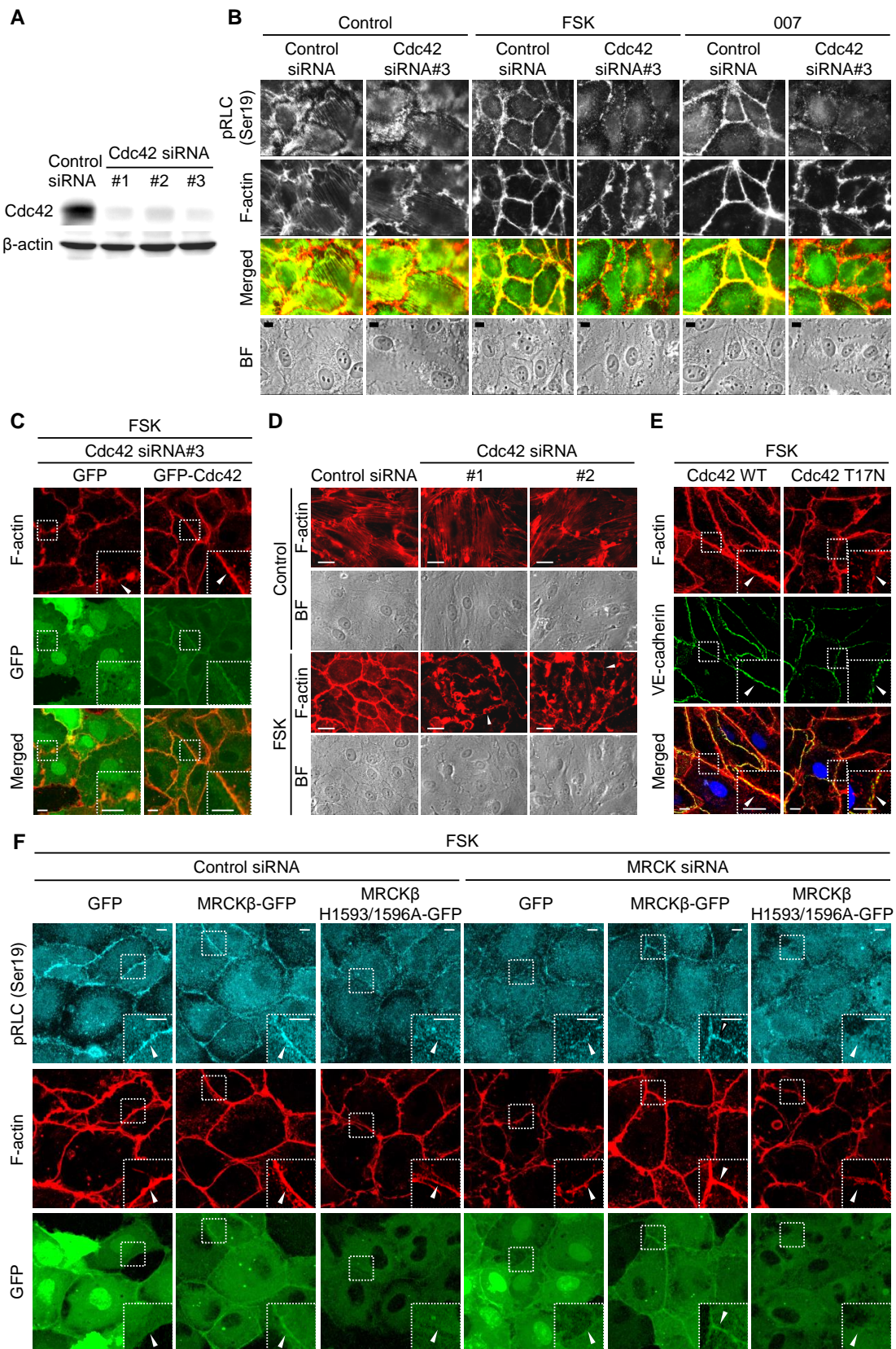


Figure 9. Cdc42 is required for Rap1-induced activation of myosin II and formation of CAB at cell-cell junctions. (A) HUVECs were transfected with control siRNA or Cdc42 siRNA (#1, #2 or #3) for 3 d, and subjected to Western blot analysis with anti-Cdc42 and anti- β -actin antibodies. (B) HUVECs transfected with either control siRNA or Cdc42 siRNA#3 were stimulated with vehicle (Control), forskolin, or 007, and immunostained with anti-pRLC at Ser19 (pRLC (Ser19)) antibody and stained with rhodamine-phalloidin (F-actin). pRLC (Ser19) and F-actin images, the merged images (F-actin: red, pRLC (Ser19): green), and the bright field images (BF) are shown. (C) HUVECs expressing either GFP or siRNA-insensitive GFP-Cdc42 were transfected with control siRNA or Cdc42 siRNA#3. The next day, the cells were replated at confluent density on collagen-coated glass base dish, starved in 0.5% BSA-containing medium 199, and stimulated with FSK. The cells were then stained with rhodamine-phalloidin (F-actin). F-actin (red) and GFP (green) images and the merged images are shown. (D) HUVECs transfected with control siRNA or Cdc42 siRNA (#1 or #2) were stimulated with vehicle (Control) or FSK, and stained with rhodamine-phalloidin (F-actin). F-actin and bright field (BF) images are shown. (E) HUVECs were transfected with the plasmid encoding either Cdc42 WT-IRES-Express Red fused to nuclear localization signal (ERed-NLS) or Cdc42 T17N-IRES-ERed-NLS, stimulated with FSK, and stained with rhodamine-phalloidin (F-actin) and immunostained with anti-VE-cadherin antibody. F-actin and VE-cadherin images and the merged images (F-actin: red, VE-cadherin: green, ERed-NLS: blue) are shown. (F) HUVECs expressing GFP, siRNA-insensitive MRCK β -GFP or siRNA-insensitive MRCK β H1593/1596A-GFP were transfected with either control siRNA or MRCK siRNA, stimulated with forskolin, and stained similar to Fig. 6 G. In C, E and F, the boxed areas are enlarged in the bottom right corner of each image. In C, E and F, arrowheads indicate cell-cell junctions. Scale bars, 20 μ m (B-F).

3-7. Rap1はFGD5を介して細胞間接着部位におけるCdc42シグナルを活性化する

次に、細胞間接着部位における活性化型Cdc42の蓄積機構を明らかにしようと試みた。内皮細胞特異的に発現するCdc42のグアニンヌクレオチド交換因子であるFGD5(facio-genital dysplasia-5)は、部分的に細胞間接着部位に局在することが報告されている(45)。そこで、FGD5の局在を観察したところ、先行報告と一致するように非刺激時では細胞膜と細胞間接着部位に弱くFGD5の局在が観察された。しかし、興味深いことにforskolin刺激によりFGD5の顕著な細胞間接着部位への局在化が観察された(Fig. 10 A, B)。さらに、Rap1の発現抑制によりforskolinによるFGD5の細胞間接着部位への局在化が阻害されたことから、Rap1はFGD5を介して細胞間接着部位におけるCdc42の活性化を惹起すると予想した。この仮説を確かめるためsiRNAによるFGD5の発現抑制を行ったところ(Fig. 10 C)、forskolin刺激によるCdc42の活性化(Fig. 10 D)および細胞間接着部位における活性化型Cdc42の蓄積が阻害された(Fig. 10 E)。しかし、FGD5の発現抑制を行ってもCdc42の細胞間接着部位への移行は阻害されなかった(未公開)。これらの結果から、Rap1はFGD5を細胞間接着部位に局在化させ、細胞間接着部位におけるCdc42の活性化を惹起することが示唆された。

さらに、FGD5による細胞間接着部位におけるCdc42の活性化が、MRCKを介したCAB形成およびCAB上でのmyosin IIの活性化に関与するか検討した。まず、MRCKの局在を観察した結果、FGD5の発現抑制によりMRCK β -GFPの細胞間接着部位への移行は阻害された(未公開)。この結果と一致するように、FGD5の発現抑制により非刺激下のstress fiberおよびstress fiber上の調節軽鎖のリン酸化は阻害されないものの、CAB形成およびCAB上の調節軽鎖のリン酸化は阻害された(Fig. 10 F)。また、FGD5のsiRNAによるCAB形成の阻害効果は、siRNAにより発現抑制を受けないFGD5をコードするプラスミドを導入することによりレスキューされた(Fig. 10 G)。

これらの結果から、Rap1はFGD5非依存的なCdc42の細胞間接着部への移行と、FGD5依存的なCdc42の活性化により細胞間接着部位における活性化型Cdc42の蓄積をもたらし、それに引き続くMRCK-myosin IIシグナルの活性化を惹起しCAB形成を促進することが示された。

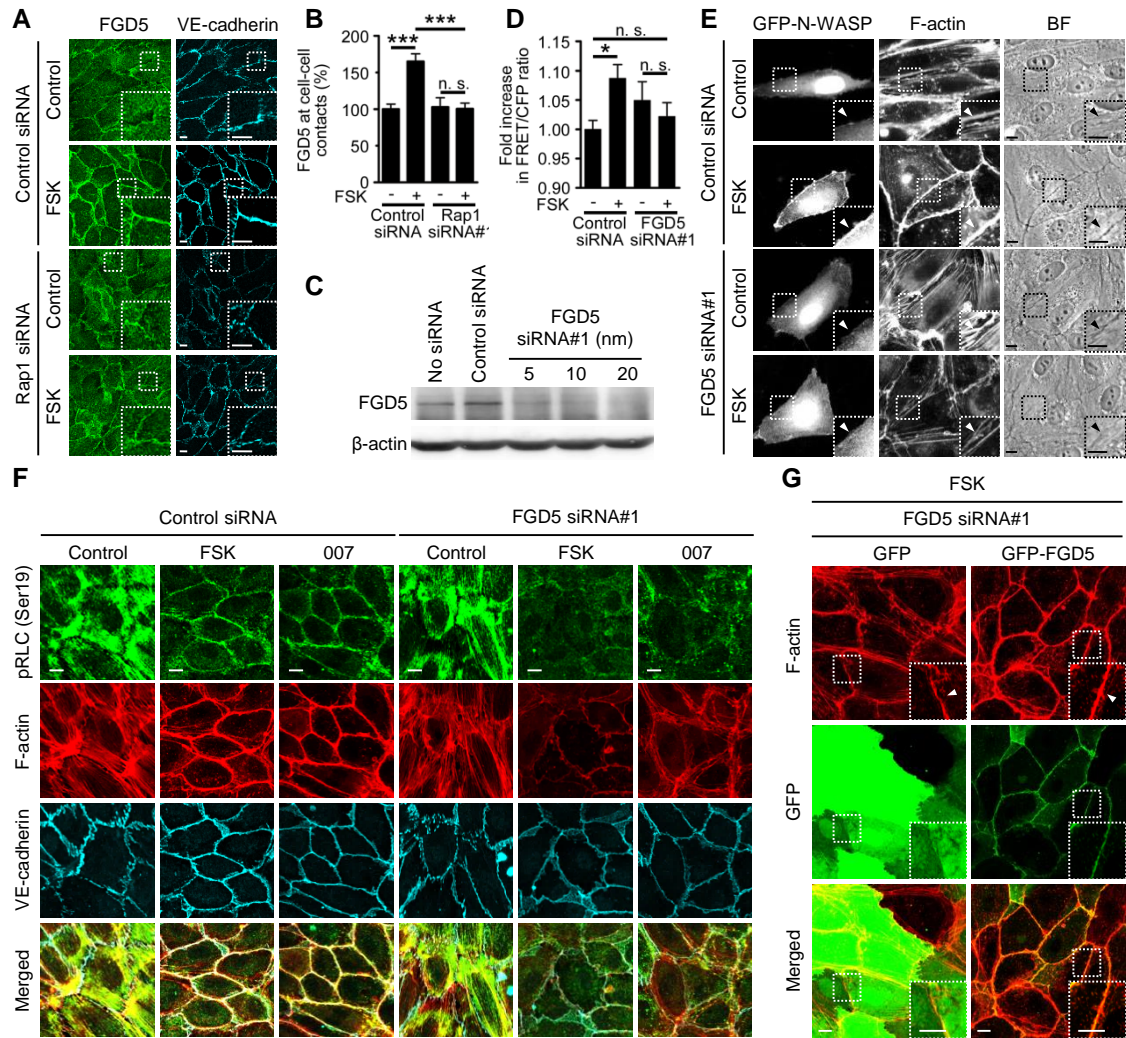


Figure 10. FGD5 is required for Rap1-induced CAB formation via activation of Cdc42 at cell-cell junctions. (A) HUVECs transfected with control siRNA or Rap1 siRNA#1 were stimulated with vehicle (Control) or forskolin, and immunostained with anti-FGD5 and anti-VE-cadherin antibodies. (B) Quantitative relative expression values of FGD5 at cell-cell contacts to that in control siRNA-transfected cells stimulated with vehicle observed in A are shown as mean \pm s.e.m. from three independent experiments ($n \geq 80$). (C) HUVECs were transfected without (No siRNA) or with control siRNA or FGD5 siRNA#1 for 3 d, and subjected to Western blot analysis with anti-FGD5 and anti- β -actin antibodies. (D) RaichuEV-Cdc42-expressing HUVECs transfected with control siRNA or FGD5 siRNA#1 were stimulated with vehicle (Control) or forskolin, and subjected to time-lapse FRET imaging similar to Fig. 8 E. The fold increase in FRET/CFP ratios 10 min after the stimulation were calculated similar to Fig. 8 F and shown as mean \pm s.e.m. from four independent experiments ($n \geq 36$). (E) HUVECs transfected with either control siRNA or FGD5 siRNA#1 for 48 h were subsequently transfected with the plasmid encoding GFP-N-WASP for 24 h, stimulated with vehicle (Control) or forskolin, and stained with rhodamine-phalloidin (F-actin). GFP (GFP-N-WASP), F-actin and bright field (BF) images are shown. (F) HUVECs transfected with either control siRNA or FGD5 siRNA#1 were stimulated with vehicle, forskolin or 007 and stained similar to Fig. 3 E. (G) HUVECs expressing either GFP or siRNA-insensitive GFP-FGD5 were transfected with control siRNA or FGD5 siRNA#1, stimulated with forskolin, and stained with rhodamine-phalloidin (F-actin). F-actin and GFP images and the merged images (F-actin: red, GFP: green) are shown. In A, E and G, the boxed areas are enlarged in the bottom right corner of each image. In E and G, arrowheads indicate cell-cell junctions. In B and D, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, significant difference between two groups. n.s., no significance between two groups. Scale bars, 20 μ m (A, E-G).

3-8. Cdc42-MRCK-myosin IIシグナルがcAMP-Epac-Rap1による血管内皮細胞のバリア機能の上昇に重要である

これまでに、cAMP-Epac-Rap1 は CAB 形成を介して VE-cadherin による血管内皮細胞間接着を増強することにより、血管内皮細胞のバリア機能を亢進させることが明らかにされてきた(20)。そこで、Rap1 による VE-cadherin 接着の安定化に対する MRCK の関与を、蛍光タンパク質を付加した分子の流動性を評価できる光退色後蛍光回復法を用いて検討した。具体的には HUVEC に VE-cadherin の C 末端に GFP を融合した VE-cadherin-GFP を導入し、細胞間接着部位における VE-cadherin-GFP の光退色後の回復を観察することにより VE-cadherin 分子の細胞間接着部位での流動性を調べた。その結果、forskolin 刺激による VE-cadherin の流動性の低下(安定化)が、MRCK の発現抑制により阻害された(Fig. 11 A-C)。従って、これまでの結果と合わせ Rap1 は MRCK を介して CAB 形成を促進することで VE-cadherin 接着を亢進させることが示唆された。

最後に cAMP-Epac-Rap1 によるバリア機能の上昇に対する、FGD5-Cdc42-MRCK-myosin II シグナルの重要性を調べた。そのため、細胞-細胞間接着に起因した電気抵抗を測定することによりバリア機能を評価できる装置 ECIS-z0 を使用し検討した。Forskolin および 007 刺激により細胞-細胞間接着に起因した電気抵抗値 Rb が上昇したものの、これら反応は siRNA による Rap1 の発現抑制またはアクチン重合阻害薬である latrunculin A による CAB 形成阻害により抑制された(未公表)。この結果は、確かに cAMP-Epac-Rap1 は CAB 形成を介して血管内皮細胞のバリア機能を亢進することを示している。さらに、blebbistatin による myosin II の阻害または siRNA による MRCK、Cdc42、FGD5 の発現抑制により forskolin および 007 刺激による電気抵抗値 Rb の上昇が抑制された(Fig. 11 D-G)。ECIS-z0 を用いた検討に加え、HUVECs の細胞間隙を通過する蛍光標識したデキストラン量を指標に血管透過性を調べたところ、forskolin 刺激による血管透過性の低下は blebbistatin および MRCK の発現抑制により阻害された(Fig. 11 H, I)。これらの結果から、Rap1 は FGD5-Cdc42-MRCK-myosin II 経路を介した CAB 形成を促進することにより内皮細胞間接着を亢進させ、バリア機能を上昇させることが示唆された。

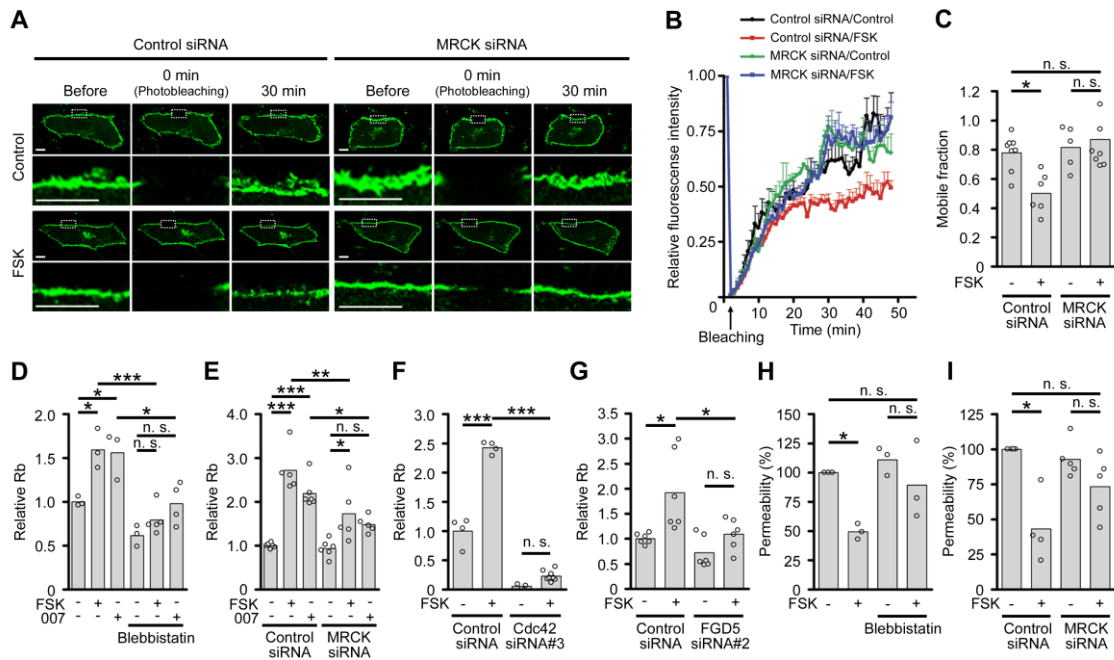


Figure 11. The FGD5-Cdc42-MRCK-NM-II pathway is essential for Rap1-induced potentiation of EC barrier function. (A) VE-cadherin-GFP-expressing HUVECs transfected with control or MRCK siRNA were stimulated with vehicle (Control) or forskolin and subjected to fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis. Representative GFP images before and at the indicated time points after photobleaching (at 0 min) are shown. The photobleached regions are boxed and enlarged beneath the original images. Scale bars, 10 mm. (B) Quantitative analysis of FRAP experiments in A. A plot of relative fluorescence intensity of VE-cadherin-GFP to that of pre-photobleaching in control siRNA-transfected cells stimulated with vehicle (black) or forskolin (red) or in MRCK siRNA-transfected cells stimulated with vehicle (green) or forskolin (blue) is shown as mean \pm s.e.m. ($n \geq 6$) (C) The mobile fractions of VE-cadherin-GFP calculated from the fluorescence recovery curves observed in B are shown ($n \geq 6$) (D-G) The junctional resistance between the adjacent cells (Rb) was measured using ESIC system as described in the Materials and methods. Relative Rb values to the matched control at 30 min after the stimulation are shown ($n \geq 3$). In D, confluent HUVECs cultured for overnight were stimulated with either vehicle, forskolin or 007 in the absence or presence of blebbistatin. The control value is that in blebbistatin-untreated cells stimulated with vehicle. In E, F and G, HUVECs transfected with control siRNA or either MRCK (E), Cdc42#3 (F) or FGD5#2 siRNA (G) were stimulated with vehicle, forskolin or 007. The control values are those in the control siRNA-transfected cells stimulated with vehicle. (H) EC permeability in the monolayer-cultured HUVECs stimulated with vehicle or forskolin in the absence or presence of blebbistatin was analyzed. Relative permeability of each group of the cells compared to that in blebbistatin-untreated cells stimulated with vehicle is shown ($n=3$). (I) EC permeability in control siRNA- or MRCK siRNA-transfected HUVECs stimulated with vehicle or forskolin was analyzed. Relative permeability of each group of the cells compared to that in control siRNA-transfected cells stimulated with vehicle is shown ($n=3$). In C-I, bars and circles indicate averages and individual data points, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant difference between two groups. n.s., no significance between two groups.

第四章 考察

cAMP-Epac-Rap1 シグナルはアクチン細胞骨格系を制御することで内皮細胞間接着を増強し内皮細胞バリアを亢進するものの、Rap1 が如何にしてアクチン細胞骨格系を制御しているのか、その制御機構は長い間未解明のままだった。そこで、本研究では Rap1 によるアクチン細胞骨格系の制御機構の解明に迫った。その結果 Rap1 は Rho を不活化することにより細胞質に局在し内皮細胞間接着の減弱に寄与する stress fiber を消失させる。さらに、Rap1 は FGD5 を介して Cdc42-MRCK シグナルを細胞間接着部位にて活性化させることにより、内皮細胞間接着の増強に寄与する CAB 形成を促進することが明らかになった。Myosin II は stress fiber と CAB、両方の形成に重要な役割を持つが、Rap1 は myosin II の上流となる低分子量 G タンパク質およびそのエフェクター分子を切り替えることで、空間的に異なるアクチン繊維の形成を制御していることが明らかになった。本研究により、長く未解明であった内皮細胞間接着の増強に重要な役割を担う CAB 形成メカニズムの概要が明らかになり、さらに FGD5 および MRCK といった内皮細胞バリアの維持・増強に関わる新たな分子が見出されたことは意義深い。

Rap1 は Cdc42-MRCK-myosin II 経路を活性化するとともに、Rho-ROCK-myosin II 経路を抑制することにより内皮細胞バリアを増強することが分かった。これまでに Rho-ROCK-myosin II 経路は初期の内皮細胞間接着の形成に寄与することが報告されているが(28, 38, 46-48)、内皮細胞同士が接着し一層の内皮細胞シートが形成されたのちはバリアの減弱に寄与する。例えば Rho-ROCK は occludin や claudin5 のリン酸化を介して血液脳関門のバリア機能を減弱させる(49)。また histamine をはじめとした炎症性刺激も Rho-ROCK 経路を活性化し、アクトミオシンを介した細胞収縮によりバリアの減弱を引き起こす(46, 48)。一方で、今回我々は定常状態での Rap1 による Rho の抑制を見出したが、Rap1 はこのような炎症性刺激による Rho の活性化も抑制しバリアの減弱を抑制する(16)。これまでに Rap1 による Rho の抑制に対し、Rap1 のエフェクターである Krit-1 の関与が示唆されている(50)。Krit-1 は家族性海綿状血管腫の原因遺伝子とされ、krit-1 の機能欠損により Rho-ROCK の活性上昇と内皮細胞バリアの減弱による脳出血が認められる。これらの知見からも、

Rap1 による Rho 経路の抑制が内皮細胞バリアの維持・増強に重要であることが示唆される。一方、C3 toxin により Rho を阻害すると、バリアの増強は見られず、むしろバリアの減弱が引き起こされる(30)。従って、Rap1 によるバリアの増強には Rho の抑制だけでは不十分であり、同時に Cdc42-MRCK-myosin II 経路を活性化し CAB 形成を促進することが重要であると考えられる。

CAB 形成および内皮細胞バリアの制御に対する MRCK の関与は本研究によって初めて明らかになった。ROCK および MRCK はともに myosin II を標的としているものの内皮細胞では異なるアクチン繊維の形成を制御し、ROCK-myosin II 経路は stress fiber の形成に寄与し、MRCK-myosin II 経路は CAB 形成に寄与する。ROCK は調節軽鎖の Thr18/Ser19 の 2 重リン酸化により、アクチンを介した細胞中心部への強い細胞収縮を生み出し内皮細胞バリアの減弱をもたらす一方(46, 48)、MRCK による調節軽鎖の Ser19 単独のリン酸化は 2 重リン酸化時のような強い収縮は齎さず形態維持に働くため(21)、内皮細胞バリアの維持・増強に寄与するものと考えられる。興味深い知見として、Rap1 の活性化により MRCK は Cdc42 依存的に細胞間接着部位へ移行することが分かった。Cdc42 による MRCK の機能制御機構のうち、Cdc42 は MRCK のキナーゼ活性には影響しないことから(40)、MRCK の局在制御に重要であると考えられる。Rap1 は活性化型 Cdc42 を細胞間接着部位に蓄積させることで MRCK を適切な部位に局在させ、効率的に CAB 形成および内皮細胞バリアを亢進させることが示唆される。

また、本研究により Rap1 による内皮細胞バリアの増強に Cdc42 が必須であることが明らかになった。今回は myosin II の調節に焦点を当て解析を行った結果、MRCK が Cdc42 の下流で働き myosin II を活性化することにより CAB 形成を促進することを突き止めた。加えて、我々は Cdc42 の下流で働き CAB 形成に関与するアクチン重合因子も見出した(未発表)ことから、Rap1 による CAB 形成に Cdc42 が中心的な役割を持つと考えられる。同様に、これまでに他のグループからも Cdc42 が内皮細胞バリアの維持・増強に関与することが報告されている(51-53)。例えば Cdc42 の常活性化変異体を内皮細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは lipopolysaccharide によるバリアの破綻が抑制される(53)。従って、Cdc42 シグナルを活性化し内皮細胞間接着を増強することにより、血管透過性の亢進に起因した疾患の治療および予防が可能となるかもしれない。

一方で、Cdc42 は様々な細胞に発現し多様な細胞機能の制御に関与している為、臨床応用を考える上では内皮細胞で特異的に Cdc42 活性を制御する作用させるための工夫が必要になると考えられる。

このような観点からも、FGD5 が Rap1 の下流で働き、細胞間接着部位における Cdc42 の活性化に必須であることを初めて明らかに出来たことは非常に意義深い。FGD5 は内皮細胞特異的に発現することから、FGD5 は優れた薬剤標的となる可能性がある。FGD5 の細胞間接着部位への移行を指標に解析を行ったところ、C 末端領域の pleckstrin homology ドメインおよび FYVE ドメインが Rap1 の活性化による細胞間接着部位への移行に必要な領域だった(未発表)。Rap1 と FGD5 の直接の結合を確認することが出来なかったが、これらのドメインに結合する分子または薬剤を同定することにより FGD5 の機能を制御することが可能になるかもしれない、今後の解析が期待される。一方、遺伝性出血性毛細血管拡張症の患者由来の内皮細胞では FGD5 の発現が健常人由来のものとは有意に低下していることが示された(54)。遺伝性出血性毛細血管拡張症は内皮細胞バリアが弱く出血傾向が認められるが、なぜ内皮細胞バリアが障害されるのかはあまり明らかになっていない。その原因として今回明らかになった FGD5-Cdc42-MRCK-myosin II 経路が障害されているために、バリア機能が減弱し出血傾向となる可能性が考えられる。今後、バリアが障害される原因解明および治療法の確立を目指し、FGD5 のノックアウトマウスの作成をはじめとした積極的な機能解析が期待される。

本研究では、内皮細胞バリアを規定する内皮細胞間接着の制御機構を明らかにするため、Rap1 を介したアクチン細胞骨格系を制御するシグナル伝達系について解析を行った。その結果、Rap1 は myosin II 活性を制御することでアクチン細胞骨格系の再編成を誘導し、内皮細胞間接着を増強すること、さらにそれに関わるシグナル伝達系の詳細を解明した(Fig. 12)。動的な内皮細胞間接着は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rho および Cdc42 活性のバランスによって調節され、Rho-ROCK-myosin II 経路が優位になると stress fiber の発達を介して内皮細胞間接着が減弱する一方、Cdc42-MRCK-myosin II 経路が優位になると CAB が発達し内皮細胞間接着が亢進することが明らかになった。Rap1 はこのバランスを Cdc42 に傾けることによって内皮細胞間接

着を亢進し、バリアを増強することが明らかになった。

本研究により、血管バリア機能を担う血管内皮細胞間接着制御に関わる分子基盤の理解が深まり、血管内皮細胞間接着の破綻が原因である疾患の治療法開発および機能的血管再生に貢献することが期待される。

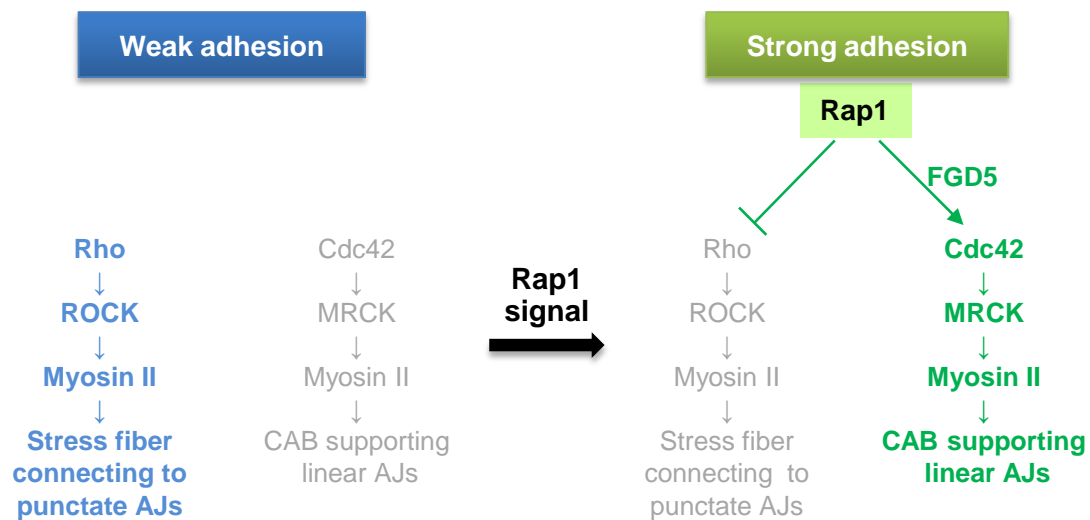


Figure 12. Schematic representation of the model that accounts for how Rap1 potentiates EC junctions. In the ECs that establish weak cell-cell adhesions, the Rho-ROCK-myosin II pathway induces formation of stress fiber connecting to punctate AJs. Once activated, Rap1 induces disruption of stress fiber through inhibition of the Rho-ROCK-myosin II pathway and formation of CAB supporting linear AJs through activation of the Cdc42-MRCK-myosin II pathway, thereby potentiating EC junctions. Thus, Rap1 tunes the NM-II activity by regulating two Rho family GTPases to control EC junctions.

第五章 謝辞

本研究を行うにあたり、御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野・教授 故中畑則道先生、准教授 守屋孝洋先生、山形大学医学部薬理学講座・准教授 小原祐太郎先生に深く感謝申し上げます。また本研究は国立循環器病センター研究所細胞生物学部との共同研究にて行われた成果を記載しました。御高配を賜りました国立循環器病センター研究所細胞生物学部・部長 望月直樹先生および室長 福原茂朋先生に謹んで厚く御礼申し上げます。さらに本論文を審査して戴き、適切な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野・教授 青木淳賢先生、薬理学分野・教授 福永浩司先生に厚く御礼申し上げます。

最後に、公私にわたり多大なるご協力と御激励を戴きました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野ならびに国立循環器病センター研究所細胞生物学部の皆様に深く感謝いたします。

- 1 Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, and B.M. Weinstein. 2009. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev.Cell* 16:209-221.
- 2 Fukuhra, S., A. Sakurai, A. Yamagishi, K. Sako, and N. Mochizuki. 2006. Vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by a small GTPase, Rap1. *J.Biochem.Mol.Biol.* 39:132-139.
- 3 Dejana, E. 2004. Endothelial cell–cell junctions: happy together. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5:261-270.
- 4 Corada. M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, E. Dejana. 1999. Vascular endothelial–cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:9815-9820.
- 5 Andriopoulou, P., P. Navarro, A. Zanetti, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1999. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:2286-2297.
- 6 Gavard, J. 2009. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett.* 583:1-6.
- 7 Weis, S., J. Cui, L. Barnes, and D. Cheresh. 2004. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J.Cell Biol.* 167:223-229.
- 8 Paul, R., Z.G. Zhang, B.P. Eliceiri, Q. Jiang, A.D. Boccia, R.L. Zhang, M. Chopp, and D.A. Cheresh. 2001. Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral

protection following stroke. *Nat.Med.* 7:222-227.

- 9 Weis, S., J. Cui, L. Barnes, and D. Cheresh. 2004. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J.Cell Biol.* 167:223-229. 39
- 10 Fukuhara, S., A. Sakurai, H. Sano, A. Yamagishi, S. Somekawa, N. Takakura, Y. Saito, K. Kangawa, and N. Mochizuki. 2005. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol.Cell Biol.* 25:136-146.
- 11 Langelier, E.G. and V.W.van Hinsbergh. 1991. Norepinephrine and iloprost improve barrier function of human endothelial cell monolayers: role of cAMP. *Am.J.Physiol.* 260:C1052-C1059.
- 12 Farmer, P.J., S.G. Bernier, A. Lepage, G. Guillemette, D. Regoli, and P. Sirois. 2001. Permeability of endothelial monolayers to albumin is increased by bradykinin and inhibited by prostaglandins. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 280:L732-L738.
- 13 Hippenstiel, S., M. Witzenrath, B. Schmeck, A. Hocke, M. Krisp, M. Krull, J. Seybold, W. Seeger, W. Rascher, H. Schutte, and N. Suttorp. 2002. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ.Res.* 91:618-625.
- 14 Schick, M.A., C. Wunder, J. Wollborn, N. Roewer, J. Waschke, C.T. Germer, N. Schlegel. 2012. Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation. *J.Physiol.* 590: 2693–2708.
- 15 Shindo, T., Y. Kurihara, H. Nishimatsu, N. Moriyama, M. Kakoki, Y. Wang, Y. Imai, A. Ebihara, T. Kuwaki, K.H. Ju, N. Minamino, K. Kangawa, T. Ishikawa, M. Fukuda, Y. Akimoto, H. Kawakami, T. Imai, H. Morita, Y. Yazaki, R. Nagai, Y. Hirata, and H. Kurihara. 2001. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 104:1964-1971.

- 16 Cullere, X., S.K. Shaw, L. Andersson, J. Hirahashi, F.W. Luscinskas, and T.N. Mayadas. 2005. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* 105:1950-1955.
- 17 Gloerich, M., J.L. Bos. 2011. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol.* 21:615-623
- 18 Chrzanowska-Wodnicka, M., S.S. Smyth, S.M. Schoenwaelder, T.H. Fischer, G.C.2nd. White. 2005. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J.Clin.Invest.* 115:680-687
- 19 Gore, A.V., M.G. Lampugnani, L. Dye, E. Dejana, B.M. Weinstein. 2008. Combinatorial interaction between CCM pathway genes precipitates hemorrhagic stroke. *Dis. Model. Mech.* 1:275-281.
- 20 Noda, K., J. Zhang, S. Fukuhara, S. Kunitomo, M. Yoshimura, and N. Mochizuki. 2010. Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. *Mol.Biol.Cell* 21:584-596.
- 21 Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, and A.R. Horwitz. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10:778-790.
- 22 Bresnick, A.R. 1999. Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:26-33.
- 23 Golomb, E., X. Ma, S.S. Jana, Y.A. Preston, S. Kawamoto, N.G. Shoham, E. Goldin, M.A. Conti, J.R. Sellers, and R.S. Adelstein. 2004. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J.Biol.Chem.* 279:2800-2808.
- 24 Conti, M.A., S. Even-Ram, C. Liu, K.M. Yamada, and R.S. Adelstein. 2004. Defects in

- cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J.Biol.Chem.* 279:41263-41266.
- 25 Tullio, A.N., D. Accili, V.J. Ferrans, Z.X. Yu, K. Takeda, A. Grinberg, H. Westphal, Y.A. Preston, and R.S. Adelstein. 1997. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:12407-12412.
 - 26 Takeda, K., H. Kishi, X. Ma, Z.X. Yu, and R.S. Adelstein. 2003. Ablation and mutation of nonmuscle myosin heavy chain II-B results in a defect in cardiac myocyte cytokinesis. *Circ.Res.* 93:330-337.
 - 27 Smutny, M., H.L. Cox, J.M. Leerberg, E.M. Kovacs, M.A. Conti, C. Ferguson, N.A. Hamilton, R.G. Parton, R.S. Adelstein, and A.S. Yap. 2010. Myosin II isoforms identify distinct functional modules that support integrity of the epithelial zonula adherens. *Nat.Cell Biol.* 12:696-702.
 - 28 Abraham, S., M. Yeo, M. Montero-Balaguer, H. Paterson, E. Dejana, C.J. Marshall, and G. Mavria. 2009. VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Curr.Biol.* 19:668-674.
 - 29 Fukuhara, S., K. Sako, T. Minami, K. Noda, H.Z. Kim, T. Kodama, M. Shibuya, N. Takakura, G.Y. Koh, and N. Mochizuki. 2008. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat.Cell Biol.* 10:513-526.
 - 30 Pannekoek, W.J., J.J.G. van Dijk, O.Y. Chan, S. Huveneers, J.R. Linnemann, E. Spanjaard, P.M. Brouwer, A.J. van der Meer, F.J.T. Zwartkruis, H. Rehmann, J. de Rooij, and J.L. Bos. 2011. Epac1 and PDZ-GEF cooperate in Rap1 mediated endothelial junction control. *Cell. Signal.* 23:2056-2064.
 - 31 Wilkinson, S., H.F. Paterson, and C.J. Marshall. 2005. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat.Cell Biol.*

7:255-261.

- 32 Yusa, K., R. Rad, J. Takeda, and A. Bradley. 2009. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat.Methods* 6:363-369.
- 33 Komatsu, N., K. Aoki, M. Yamada, H. Yukinaga, Y. Fujita, Y. Kamioka, and M. Matsuda. 2011. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol.Biol.Cell* 22:4647-4656.
- 34 Yoshizaki, H., Y. Ohba, K. Kurokawa, R.E. Itoh, T. Nakamura, N. Mochizuki, K. Nagashima, and M. Matsuda. 2003. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J.Cell Biol.* 162:223-232.
- 35 Sakurai, A., S. Fukuhara, A. Yamagishi, K. Sako, Y. Kamioka, M. Masuda, Y. Nakaoka, and N. Mochizuki. 2006. MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of vascular endothelial cadherin-mediated cell adhesion. *Mol.Biol.Cell* 17:966-976.
- 36 Lo, C.M., C.R. Keese, and I. Giaever. 1999. Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. *Exp.Cell Res.* 250:576-580.
- 37 Pannekoek, W.J., J.J.G. van Dijk, O.Y. Chan, S. Huveneers, J.R. Linnemann, E. Spanjaard, P.M. Brouwer, A.J. van der Meer, F.J.T. Zwartkruis, H. Rehmann, J. de Rooij, and J.L. Bos. 2011. Epac1 and PDZ-GEF cooperate in Rap1 mediated endothelial junction control. *Cell.Signal.* 23:2056-2064.
- 38 Wimmer, R., B. Cseh, B. Maier, K. Scherrer, and M. Baccarini. 2012. Angiogenic sprouting requires the fine tuning of endothelial cell cohesion by the Raf-1/Rok-alpha complex. *Dev.Cell* 22:158-171.
- 39 Chew, T.L., R.A. Masaracchia, Z.M. Goeckeler, and R.B. Wysolmerski. 1998. Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase

(gamma-PAK). *J.Muscle Res.Cell Motil.* 19:839-854.

- 40 Leung, T., X.Q. Chen, I. Tan, E. Manser, and L. Lim. 1998. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol.Cell.Biol.* 18:130-140. 43
- 41 Tan, I., J. Lai, J. Yong, S.F. Li, and T. Leung. 2011. Chelerythrine perturbs lamellar actomyosin filaments by selective inhibition of myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase. *FEBS Lett.* 585:1260-1268.
- 42 Zeng, Q., D. Lagunoff, R. Masaracchia, Z. Goeckeler, G. Cote, and R. Wysolmerski. 2000. Endothelial cell retraction is induced by PAK2 monophosphorylation of myosin II. *J.Cell Sci.* 113:471-482.
- 43 Stockton, R.A., E. Schaefer, and M.A. Schwartz. 2004. p21-activated Kinase Regulates Endothelial Permeability through Modulation of Contractility. *J.Biol.Chem.* 279:46621-46630.
- 44 Gavard, J., and J.S. Gutkind. 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat.Cell Biol.* 8:1223-1234.
- 45 Kurogane, Y., M. Miyata, Y. Kubo, Y. Nagamatsu, R.K. Kundu, A. Uemura, T. Ishida, T. Quertermous, K. Hirata, and Y. Rikitake. 2012. FGD5 mediates proangiogenic action of vascular endothelial growth factor in human vascular endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 32:988-996.
- 46 Millan, J., R.J. Cain, N. Reglero-Real, C. Bigarella, B. Marcos-Ramiro, L. Fernandez-Martin, I. Correias, and A.J. Ridley. 2010. Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC.Biol.* 8:11.
- 47 Hoelzle, M.K., and T. Svitkina. 2012. The cytoskeletal mechanisms of cell cell junction formation in endothelial cells. *Mol.Biol.Cell* 23:310-323.

- 48 Huveneers, S., J. Oldenburg, E. Spanjaard, G. van der Krogt, I. Grigoriev, A. Akhmanova, H. Rehmann, and J. de Rooij. 2012. Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J.Cell Biol.* 196:641-652.
- 49 Yamamoto, M., S.H. Ramirez, S. Sato, T. Kiyota, R.L. Cerny, K. Kaibuchi, Y. Persidsky, and T. Ikezu. 2008. Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho kinase in brain endothelial cells. *Am.J.Pathol.* 172:521-533.
- 50 Glading, A., J. Han, R.A. Stockton, and M.H. Ginsberg. 2007. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell-cell junctions. *J.Cell Biol.* 179:247-254.
- 51 Kouklis, P., M. Konstantoulaki, S. Vogel, M. Broman, and A.B. Malik. 2004. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ.Res.* 94:159-166.
- 52 Broman, M.T., D. Mehta, and A.B. Malik. 2007. Cdc42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability. *Trends Cardiovasc.Med.* 17:151-156.
- 53 Ramchandran, R., D. Mehta, S.M. Vogel, M.K. Mirza, P. Kouklis, and A.B. Malik. 2008. Critical role of Cdc42 in mediating endothelial barrier protection in vivo. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 295:L363-L369.
- 54 Fernandez-Lopez, A., E.M. Garrido-Martin, F. Sanz-Rodriguez, M. Pericacho, A. Rodriguez-Barbero, N. Eleno, J.M. Lopez-Novoa, A. Düwell, M.A. Vega, C. Bernabeu, L.M. Botella. 2007. Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* 16:1515-1533